

MÁRIO NIEWEGLOWSKI FILHO

A INFLUÊNCIA DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS  
NA DEGRADAÇÃO DO MALATHION E DELTAME-  
THRINA EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO

Tese apresentada à Coordenação do Curso  
de Pós-Graduação em Ciências Biológicas,  
área de concentração em Entomologia, da  
Universidade Federal do Paraná, para ob-  
tenção do Título de Mestre em Ciências  
Biológicas.

CURITIBA

1994

# **A INFLUÊNCIA DE FATORES BIÓTICOS E ABIÓTICOS NA DEGRADAÇÃO DO MALATHION E DELTAMETHRINA EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO**

***MÁRIO NIEWEGLOWSKI FILHO***

Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão Examinadora:

**Orientador:**

Prof. Dr. Armando Antunes de Almeida

**Co-orientador:**

Prof. Dr. Flávio Antonio Lázzari

**Banca Examinadora:**

Prof. Dr. Armando Antunes de Almeida

Prof. Dr. Flávio Antonio Lázzari

MSc. Edilson Batista de Oliveira

Curitiba, 22 de novembro de 1994.

## **OFEREÇO**

**A DEUS**

***Aos meus pais Dorothéa e Mário (In memorian), a Ana Márcia e Maria Luisa, esposa e filha, pelo estímulo, apoio e compreensão.***

## AGRADECIMENTOS

Expresso meus agradecimentos, àqueles que colaboraram com a realização do presente estudo, em especial, às seguintes pessoas e Instituições:

Aos professores Doutores Armando Antunes de Almeida e Flávio A. Lázzari, pela confiança, estímulo, dedicação, valorosa orientação e amizade;

Ao Mestre Engenheiro Agrônomo Edilson Batista de Oliveira, da EMBRAPA, pela orientação técnica e amizade;

Ao Engenheiro Agrônomo Luiz Carlos Hatschbach, Chefe da Divisão da Defesa Sanitária Vegetal-SEAB, pela grande amizade, incentivo e ajuda incondicional;

Ao Engenheiro Agrônomo Osvaldo de Castro Olhson, gerente de laboratório de análises de Sementes e a Elizabeth Perancetta Krefft, laboratorista de sementes, da Empresa Paranaense de Classificação de produtos-CLASPAR, pela amizade, sugestões, e apoio técnico;

Ao Engenheiro Agrônomo Roberto Thomaz do laboratório Marcos Henrietti, convênio SEAB-UFPR pela amizade, colaboração e apoio técnico;

À Mestra Engenheira Química Vera Lúcia Gomes Kamienski, às químicas Zélia Aparecida Bill e Emiliania Borges Tiboni, aos técnicos químicos Marcos Gerônimo Schilipack e Elisa Maria Suchek, pela amizade e apoio técnico;

À Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná-SEAB, pela liberação para realização do presente trabalho;

Ao curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração entomologia, da Universidade Federal do Paraná, por possibilitar a realização do presente trabalho;

À empresa Cargill Agrícola S.A., pelo fornecimento da semente de milho utilizada neste experimento;

Ao companheiro de curso e amigo Sionei Ricardo Bonato pela amizade, valioso apoio técnico e prestimoso auxílio na editoração do trabalho;

Aos colegas de curso e amigos Antonio C.F da Costa, Helena S.R. Cabette, Luciane Marinoni, Marcia E. Faria, Marinêz I. Marques, Ricardo Corbetta, Samira Chahad, Stella Maris S. Silva, Vânia Graciele Lezan Kowalczyk e Dalton Tadeu R. dos Santos, pelo apoio e amizade;

Ao meu irmão Ronald Nieweglowski, sua esposa Roseli M. Nieweglowski e a Hosana V. Dordenoni, pela grande amizade, companheirismo e apoio.

## ÍNDICE

### PARTE I

#### **DEGRADAÇÃO DE MALATHION E DELTAMETHRINA EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO**

RESUMO.....	2
SUMMARY.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	4
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Trabalhos apresentados junto a Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná para fins de cadastramento.....	6
2.1.1. Trabalhos apresentados pelas indústrias produtoras referentes a resíduos de Malathion.....	7
2.1.2. Trabalhos apresentados pelas indústrias produtoras referentes a resíduos de Deltamethrina.....	8
2.2. Trabalhos obtidos em literatura referentes aos ingredientes ativos Malathion e Deltamethrina.....	8
2.2.1. Trabalhos obtidos em literatura referentes ao ingrediente ativo Malathion.....	9
2.2.2. Trabalhos obtidos em literatura referentes ao ingrediente ativo Deltamethrina.....	14
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Delineamento experimental.....	18
3.2. Análise estatística.....	19
3.3. Determinação do teor de umidade dos grãos.....	20
3.4. Método analítico para determinação do Malathion.....	20

3.5. Método analítico para determinação da Deltamethrina.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
4.1. Degradação do Malathion, pela temperatura, U.R. (%), umidade do grão, luminosidade e presença de microorganismos fúngicos.....	25
4.1.1. Degradação do Malathion pela temperatura e U.R. (%).....	26
4.1.1.1. Degradação do Malathion pela temperatura e U.R. (%)	27
4.1.1.2. Degradação do Malathion em consequência do teor de umidade do grão.....	30
4.1.1.3. Degradação do Malathion pela luminosidade.....	31
4.1.1.4. Degradação do Malathion por microorganismos fúngicos.....	32
4.2. Deltamethrina.....	33
4.2.1. Degradação da Deltamethrina pela temperatura, U.R. (%), teor de umidade do grão, luminosidade e presença de microorganismos fúngicos.....	33
4.2.1.1. Degradação da Deltamethrina pela temperatura, U.R. (%), teor de umidade do grão e luminosidade.....	36
4.2.1.2. Degradação da Deltamethrina por microorganismos fúngicos.....	39
5. CONCLUSÕES.....	40
6. SUGESTÕES.....	42
7. REFERÊNCIAS CITADAS.....	43

## PARTE II

### **COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO**

RESUMO.....	46
SUMMARY.....	47
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.1. Plaqueamento em Papel Filtro (Blotter).....	53
3.2. Plaqueamento em Meio Ágar de Suco de Tomate (MAST) e Batata Dextrose-Ágar (MBDA).....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	55
5. CONCLUSÕES.....	65
6. SUGESTÕES.....	66
7. REFERÊNCIAS CITADAS.....	67



## **PARTE I**

### ***DEGRADAÇÃO DE MALATHION E DELTAMETHRINA EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO***

## **RESUMO**

### **DEGRADAÇÃO DE MALATHION E DELTAMETHRINA EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO**

O armazenamento de grandes quantidades de grãos e sementes propicia condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento de insetos e fungos. Estes organismos, independentemente ou associados, provocam grandes perdas qualitativas e quantitativas em milho armazenado. Para minimizar a incidência de tais organismos, várias medidas são adotadas, incluindo o uso de inseticidas e fungicidas específicos. Em decorrência de longos períodos de armazenamento e devido aos tratamentos sucessivos, pode ocorrer o acúmulo de resíduos nos grãos, tornando-se necessário conhecer o perfil de degradação de tais produtos ao longo do tempo. Para tanto, foram avaliados neste experimento a influência dos fatores bióticos (fungos) e abióticos (temperatura, luminosidade, umidade relativa do ar e umidade dos grãos) na degradação do Malathion e Deltamethrina. As dosagens utilizadas foram: K-obiol 25 CE (Deltamethrina), 14 ml/t e 20 ml/t e Malatol 1000 CE (Malathion) 20 ml/t. Cada um dos experimentos foi composto de 24 amostras de 1kg, analisadas periodicamente durante 181 dias de armazenamento, para verificar o nível de degradação dos ingredientes ativos (i.a.) Malathion e Deltamethrina. Concluiu-se que, nas condições deste experimento, o Malathion e a Deltamethrina apresentaram tendência de redução da quantidade de resíduo, sendo estatisticamente significativo para Deltamethrina dosagens de 14 ml/t e 20 ml/t e não significativo, para o Malathion dosagem de 20 ml/t.

**SUMMARY**  
**DEGRADATION OF MALATHION AND DELTAMETHRIN IN STORED**  
**GRAIN OF CORN**

The storage of large quantities of grain, allow the development of insects and fungi. These organisms associated or not might provoke heavy quantitative and qualitative loses on stored them. To reduce the presence of these organisms, insecticides and fungicides are used to treat corn. As a result of successive chemical treatments residues might build up, being necessary to know the speed of degradation of these products during storage. Biotic and abiotic factors such as presence of fungi, temperature, relative humidity, grain moisture and light were studied to evaluate their influence upon the degradation of Malathion and Deltamethrin. The doses used were: K-obiol 25 CE (Deltamethrin) 14 ml/t e 20 ml/t e Malatol 1000 CE (Malathion) 20ml/ t. Each treatment was composed by 24 replicates of 1 kg periodically analyzed during 181 days of storage to verify the degradation of Malathion and Deltamethrin. As conclusion, Malathion and Deltamethrin demonstrated tendency in the redution of residue quantity. It was statistically significant for Deltamethrin 14 ml/t e 20 ml/t, and not significant for Malathion 20 ml/t.

## 1 . INTRODUÇÃO

O armazenamento de grandes quantidades de grãos e sementes, em silos e armazéns, devido às condições favoráveis de temperatura e umidade e de outras como, o volume da massa de grãos, a presença de materiais estranhos e impurezas, favorecem o desenvolvimento de insetos e fungos. Para minimizar a incidência de tais agentes, que diminuem o volume produzido e comprometem a qualidade dos grãos para consumo e das sementes para plantio, são adotadas uma série de medidas, dentre elas, o uso de inseticidas e fungicidas específicos.

Tais produtos químicos contribuem para que as produções sejam preservadas, por períodos mais longos de tempo, com suas características originais inalteradas,. entretanto, é crescente a preocupação, relativa à presença de resíduos em grãos e sementes, em quantidade que comprometa a saúde humana ou animal e mesmo que contamine o meio ambiente.

Segundo "Assessment of Chemical Contaminants in Food Report on the Results of the UNEP/FAO/WHO Programme on Health-Related Environmental Monitoring, London (1988)", é essencial para a saúde e bem estar do homem, tomarem-se providências que dêem segurança para a obtenção de alimentos saudáveis . Neste sentido, o monitoramento dos alimentos fornece informações sobre os níveis de contaminação e o tempo de permanência dos seus resíduos. O conhecimento destes fatores são importantes para se garantir a qualidade dos suprimentos alimentares, para o gerenciamento dos alimentos e do meio ambiente agrícola.

De acordo com "Guidelines on Pesticide Residue Trials to Provide Data for the Registration of Pesticide and the Establishment of Maximum Residue Limits, FAO (1986)", experimentos que visem ao estudo da degradação de inseticidas, de um determinado ingrediente ativo, objetivando o estabelecimento de sua carência (período

entre a última aplicação e a colheita do material tratado), devem ser realizados com formulações comerciais utilizando-se equipamentos similares aos existentes nas fazendas. As dosagens devem ser correspondentes àquelas aprovadas oficialmente pelos órgãos governamentais para o produto comercial. Deve observar-se, ainda, que estudos regionalizados são importantes pois, em dado tempo e dosagem, os resíduos de um determinado produto aplicado, também variarão em função do local e do clima. Os limites de tais variações são importantes para definir a segurança e particularmente, estabelecer os limites máximos de resíduos.

O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a influência da temperatura, umidade relativa, umidade dos grãos, luminosidade e presença de fungos na degradação do Malathion e Deltamethrina em milho armazenado em condições de laboratório.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

As fontes de informações sobre resíduos de agrotóxicos são de duas origens:

- As constantes nos processos das marcas comerciais, que tiveram solicitados, o registro ou cadastro, nos órgãos competentes Federais ou Estaduais, para fins de comercialização e uso;
- As obtidas em literatura e geradas em decorrência de estudos para a determinação do período de degradação de um determinado ingrediente ativo, ou de monitoramentos realizados a nível de lavoura e em estabelecimentos de comercialização de produtos agrícolas.

Dentro deste contexto serão apresentadas a seguir, as informações pertinentes ao Malathion e Deltamethrina.

### **2.1. Trabalhos apresentados junto a Secretaria da Agricultura e do Abastecimento do Estado do Paraná, para fins de cadastramento:**

A Lei nº 7827, de 29 de dezembro de 1983, estabelece em seu artigo 1º, que a distribuição e comercialização de agrotóxicos no Estado do Paraná está condicionada a prévio cadastro junto a Secretaria da Agricultura e do Abastecimento. No parágrafo 3º, letra c, do mesmo artigo, está estabelecida a necessidade de apresentação de cópia do boletim de análise de resíduo do produto, para as culturas em que é indicado, devendo ser o boletim emitido por laboratório oficial do Brasil.

Devido a esta exigência legal, para cada produto comercializado e utilizado no Estado, existe o respectivo processo, que corresponde ao pedido de cadastramento. Desta forma, tendo-se acesso aos processos de todas as marcas comerciais, que contém por ingrediente ativo o Malathion e a Deltamethrina, analisou-

se a existência e o teor dos trabalhos apresentados pelas empresas fabricantes. Deve-se informar, ainda, que a data de 25 de agosto de 1992 foi utilizada como limite referencial para as análises. Assim, se para algum produto à base dos ingredientes ativos Malathion e Deltamethrina, usados em grãos armazenados, especificamente para o milho, entrou com pedido de cadastramento posterior a esta data, o processo não foi analisado e considerado.

Optou-se por analisar todas as marcas comerciais com os ingredientes ativos Malathion e Deltamethrina, passíveis de serem utilizadas em grãos armazenados de milho, e não somente aquelas trabalhadas no experimento. Foi utilizado este critério visto que, os estudos realizados para uma determinada marca comercial, podem ser extrapolados para outra, atendida a necessidade da concentração do produto, dosagem e demais indicações de uso, corresponderem as das marcas comerciais estudadas. Isto ocorre devido a que os métodos analíticos empregados, detectam exclusivamente o ingrediente ativo das formulações e não, os demais elementos que as compõem.

#### **2.1.1 . Trabalhos apresentados pelas indústrias produtoras referentes a resíduos de Malathion**

Nenhuma das marcas comerciais, com o Malathion como ingrediente ativo apresentaram trabalhos técnicos referentes a resíduos em grãos armazenados, incluindo-se aí a cultura do milho. Apresentou-se apenas a monografia sobre o ingrediente ativo, publicada através da Portaria SNVS nº 10 de 8 de março de 1985, do Ministério da Saúde ou a Monografia publicada no Diário Oficial da União de 31 de outubro de 1990.

### **2.1.2 .Trabalhos apresentados pelas indústrias produtoras referentes a resíduos de Deltamethrina**

As marcas comerciais que possuem o ingrediente ativo Deltamethrina e que estão registradas para grãos armazenados, são o K-obiol 25 CE registro nº 011483-88 e o K-obiol 2P registro nº 022987, recomendado para milho em espiga com ou sem palha. Ambos, apresentaram o mesmo trabalho sob o título "Los Resíduos de Deltamethrin en los Vegetales y o Otros Productos Alimentícios". Especificamente quanto ao milho armazenado a granel, o referido trabalho cita que em Camerum, observou-se em grãos de milho armazenados na forma de espigas inteiras, dentro de celeiros com telhado de palha, sistema tradicionalmente utilizado pela população e tratados através de pulverização, nas dosagens de 5 e 2,5 ppm, ao cabo de cinco meses, uma degradação de 5 para 1,25 ppm, na primeira dosagem e de 2,5 para 0,47 ppm na segunda dosagem . É enfatizado no trabalho que as dosagens tão elevadas eram experimentais. Ainda é mencionado que no Brasil, em grãos armazenados a granel, através de tratamento realizado com pulverização, revelou degradação menos intensa que nos celeiros mencionados no parágrafo anterior. Em dosagens de 0,5 e 1 ppm, a degradação foi reduzida, 0,5 e 0,7 ppm respectivamente, em um período de 10 meses. Em contrapartida, com uma dosagem mais elevada de 2 ppm, foi registrado ao término do mesmo período de tempo, redução para 1ppm, correspondente a 50%.

### **2.2. Trabalhos obtidos em literatura referentes aos ingredientes ativos Malathion e Deltamethrina**



### **2.2.1. Trabalhos obtidos em literatura referentes ao ingrediente ativo Malathion**

De acordo com UNEP; FAO & WHO (1988), o Malathion tem sido usado como inseticida e acaricida de largo espectro, para o controle de diversas pragas agrícolas ou de insetos vetores em saúde pública, sendo aplicado, principalmente, em lavouras de cereais. Relata-se que 90% dos níveis de resíduos encontrados foram abaixo dos limites de determinação. A mais notável exceção foi em grãos domésticos nos Estados Unidos da América, em 1984 - 1985. Embora a média dos valores tenha sido inferior a 20 ppm, 90% destes foram superiores a 3 ppm. Também, 90% das análises ficaram abaixo do nível máximo permitido. Relatou-se que foram detectados, na Tunísia, valores médios elevados para farinha de trigo e farelo, de 99 e 175 ppm, respectivamente. A conclusão do relatório foi de que, o nível de resíduo apresentou-se baixo para muitas amostras. A principal exceção, ocorre para grãos de cereais em alguns países.

O "Codex Alimentarius", comissão que em junho de 1986 era composta por 129 países, é hoje responsável pela análise e estabelecimento dos níveis de resíduos máximos admitidos para os ingredientes ativos de agrotóxicos a nível mundial. Em publicação denominada CODEX ALIMENTARIUS; FAO & WHO (1986), foi estabelecido o limite máximo de resíduo permitido ou tolerância, para o Malathion em grãos de cereais, de 8 mg ou 8 ppm.

Normas legais do Ministério da Saúde (1985,1990) estabelecem 8 mg ou 8 ppm, sendo portanto, o limite máximo de resíduo admitido no Brasil, em consonância com as normas internacionais.

ANDEREGG & MADISEN (1983), desenvolveram trabalhos tratando duas porções de trigo armazenado, de forma distinta. Em uma das porções foi tratado 100%

dos grãos, correspondendo a 11,4 ppm. Em outra foram tratados 5% dos grãos, correspondendo a uma quantidade aplicada de Malathion de 228 ppm. O trabalho foi conduzido por um ano, com temperatura de 26°C e umidade relativa do ar de 60%. Para avaliar-se a degradação do Malathion, o carbono da fórmula foi marcado (C14-malathion). Não foi encontrada diferença significativa na degradação do C14-malathion em amostras de trigo nas quais, foram tratadas 5% ou 100% das sementes. Isto é, tanto o tratamento uniforme como o não uniforme, não apresentaram diferença quanto à degradação do Malathion. Também os produtos da degradação recuperados, não diferiram em termos de quantidade. Após 12 meses da realização do tratamento, o trigo continha 22,2% do Malathion originalmente aplicado. O autor menciona que MINETT & WILLIAMS (1971,1976) fizeram referência no sentido de que, a distribuição irregular do inseticida proporcionaria persistência superior. ANDEREGG & MADISEN (1983), argumentam que uma diferença importante entre os estudos situa-se no fato que MINETT & WILLIAMS trataram uma quantidade menor da massa de grãos, 1 a 2%.

COG BURN *et al.* (1990), trataram grãos longos de arroz integral com Malathion, na dose de 14 ppm, sendo feitas amostragens depois de uma, seis e 12 semanas. As amostras foram processadas, na forma de arroz integral ou parboilizado. Em arroz cozido não parboilizado, foi obtida a média de 0,016 ppm e em arroz parboilizado 0,013 ppm, de Malathion. O trabalho em questão, não mencionou quanto tempo, após o tratamento, foi realizado o cozimento. Análises de amostras de arroz integral, tomadas 24 horas após o tratamento, revelaram na deposição encontrada, cerca de 12 ppm, estava pouco abaixo da quantidade aplicada. A diferença foi justificada em função de que parte do produto aplicado, perdeu-se durante o processo de tratamento ou devido à degradação muito rápida, ocorrida entre o intervalo do tratamento e a amostragem. Quase metade do Malathion foi perdido no arroz integral

bruto, após uma semana. Cerca de 95% do Malathion, permanecido no arroz integral bruto, uma semana após o tratamento, foi destruído pela parboilização.

GAUGHEY (1971), citado por COG BURN *et al.* (1990), mensurou os resíduos em arroz integral bruto e em frações moídas, encontrando muito do produto depositado na casca do primeiro, e muito pouco Malathion foi encontrado no arroz moído.

WINTERSTEEN & FOSTER (1992), demonstraram que a temperatura e a umidade do grão afetam a degradação do Malathion. Milho tratado anteriormente e, após a secagem a 71°C e 48°C, contendo 19-20% de umidade, perdeu significativamente mais Malathion que o milho tratado e seco a 21°C, com 12% de umidade. Estes autores argumentam que, tais resultados provêm de diferenças na volatilização; e outra via de degradação pode ser a hidrólise. No caso da secagem a 21°C, temperatura relativamente baixa, requereu um período de secagem longo, de 24 horas, expondo o Malathion a condições de alta umidade relativa, segundo o autor, favorecendo a hidrólise. Considerou que, comparativamente, a volatilização parece causar maiores perdas que a hidrólise. Outro aspecto importante analisado, foi que o material armazenado a 3°C, proporcionou degradação lenta, resultando que nenhuma variável considerada no trabalho, tempo decorrido da aplicação, formulação do produto utilizado (pó ou concentrado emulsionável), temperatura de secagem, afetou a velocidade de degradação. O armazenamento a 16°C resultou em diferenças significativas na velocidade de degradação do Malathion. As temperaturas de secagem afetaram significativamente a velocidade de degradação para aplicações feitas anteriormente a ela.

STRONG & SBUR (1960), realizaram estudo aplicando 10 ppm de Malathion em trigo, com 10% de umidade. O material foi colocado em locais com temperaturas de

15,55; 21,11; 26,66; 32,22; 37,77; 43,33 e 48,88°C. A eficiência do produto decresceu com o aumento da temperatura.

TYLER *et al.* (1966), citados por SNELSON(1987), confirmaram experimentos preliminares, os quais mostraram que a degradação do Malathion foi mais rápida em grãos recém colhidos, comparativamente àqueles que estavam armazenados há 9 meses, antes do tratamento. A perda aparente do inseticida foi sempre maior do que o esperado, entretanto, de modo particular, para os grãos recém colhidos. Foi mostrada degradação extremamente rápida, após as primeiras horas da aplicação. Após um mês, entretanto, os resíduos não diferiram significativamente, entre os grãos que estavam armazenados e os recém colhidos.

STRONG & SBUR (1960), realizaram experimento, com o objetivo de verificar a eficiência de uma dose de 10 ppm de Malathion no controle de *Sitophilus granarius* (L), *Sitophilus oryzae* (L) e *Tribolium confusum* Duv. em amostras de trigo com teores de umidade de 10%, 12%, 14%, 16%, 18% e 20% e temperatura de 15,5°C. Observou-se, que aumentando o teor de umidade do grão, diminuiu a mortalidade destes insetos indicando ser este controle mais eficaz, nos teores de umidade mais baixos de 12 e 14%.

QUINLAN (1982), citado por STOREY (1982), observou ser o fracasso na aplicação de Malathion, em grãos armazenados, ocorrentes quando da excessiva umidade nos grãos ou devido a altas temperaturas ou ambas. Recomenda que os grãos não devem ser tratados quando seu teor de umidade esteja acima de 13% e a temperatura acima de 32°C. Demonstrou que, aplicando-se 7,5 ppm de Malathion, com 10, 12, 14 e 16% de umidade no grão, após 24 horas a quantidade de resíduos encontrado foi 6,2, 6,1, 5,7 e 5,0 ppm respectivamente. Da mesma forma, houve relação decrescente de resíduo, com o aumento da umidade do grão após 6, 12, 24 e

36 semanas, verificando-se neste último período 2,7, 2,5, 0,3 e menos de 0,1 ppm de resíduo, para 10, 12, 14 e 16% de umidade do grão.

COOK (1955), COOK & OTTES (1959) e MITCHELL (1961), citados na micro-ficha EPA/600/x-84/328, mencionam o efeito da luz ultravioleta (2537 angstrom) provocando a completa degradação do ingrediente ativo a ponto de não serem identificados nenhum dos produtos de degradação.

ANDEREGG & MADISEN (1983), citados por SNELSON (1987), estudaram a degradação do C14-Malathion em grãos de milho e trigo armazenados, inoculando-os com *Aspergillus glaucus*. Grãos livres de fungos de armazenamento, tiveram suas superfícies esterilizadas, antes do tratamento com C14-Malathion e a inoculação do fungo. Após seis meses, o milho inoculado continha 74% do radio-carbono aplicado comparado com 92% no milho esterilizado. Similarmente, o trigo inoculado continha 86% do radio-carbono, comparado com 93% no trigo estabilizado. A quantidade mais baixa de radio-carbono recuperado, para os grãos inoculados, poderia ser resultado também de perdas por volatilização ou transformação em Co2-14, ambos verificados no estudo. Embora o Malathion tenha degradado nos grãos esterilizados e nos inoculados, os esterilizados continham quantidades maiores de C14-Malathion, do que os grãos inoculados, após seis meses.

Na micro-ficha da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, nº EPA/600/x-8/328 é relatado, que LEWIS *et al.* (1975), isolaram, da água fresca de lagoa, o fungo *Aspergillus orizae*, o qual foi capaz de transformar o Malathion em beta-monoácido malathion (97%) e ácido dicarboxílico malathion (3%). Entretanto, as taxas de conversão foram mais vagarosas do que a observada para a cultura pura de bactéria. Resultados similares foram obtidos por PARIS *et al* (1975b), os quais detectaram remoção por bactérias de Malathion *in vitro*, 5000 vezes mais rápida do

que a remoção por fungos nas mesmas condições de trabalho. Também o desaparecimento rápido de Malathion foi observado em cultura mista de fungos e bactérias, com meia-vida de 2,2 horas.

### **2.2.2. Trabalhos obtidos em literatura referentes ao ingrediente ativo Deltamethrina**

Segundo "Pesticides Residues in Food-1988; Report Sponsored Jointly by Food and Agriculture Organization of the United Nations-FAO and World Health Organization-WHO - FAO Plant Production and Protection Paper", menciona ensaios realizados na Itália e Austrália com trigo duro e mole tratados com Deltamethrina. Na Itália foram realizados em seis locais diferentes, com dosagens variadas totalizando 720 amostras. O máximo de resíduo de Deltamethrina encontrado, para os tratamentos de 0,25; 0,5; 1,0 ppm foi de 0,14; 0,39; 1,29 ppm, respectivamente depois de 42 dias, e 0,09; 0,32 e 0,47 ppm depois de 90 dias. Em grãos armazenados os resíduos que foram encontrados não se degradaram rapidamente, as grandes perdas ocorreram no processamento do material. Nenhum resíduo foi detectado em farinha ou pão. Em ensaios realizados na Austrália, foi aplicada a dosagem de 1,0 ppm em trigo. Em armazém, o máximo de resíduo foi de 1.0 ppm. O processamento do trigo levou a detecção de um resíduo máximo em farinha branca de 0,08 ppm.

De acordo com HALLS & PERIAM (1980), citados por SNELSON (1987) e pela WHO (1990), os níveis de resíduos em grãos de trigo tratados com Deltamethrina, na dosagem de 2 ppm, foi de 1,08 ppm, após nove meses de armazenamento. Já, a aplicação feita na dosagem de 1,0 ppm, após o mesmo período de tempo, levou a detecção de 0,41 ppm do ingrediente ativo, no grão, e 0,05 ppm, em pão branco.

NOBLE *et al.* (1982), citados por SNELSON (1987), aplicaram quatro doses de Deltamethrina em grãos armazenados de trigo. Os resultados obtidos com a dosagem de 2,07 mg/kg, aplicado à temperatura de 25°C, com 12% de umidade do grão e umidade relativa do ar de 54%, foram superiores àqueles detectados na dose de aplicação 1,95 mg/kg, com temperatura de 35°C, 15% de umidade do grão e umidade relativa do ar 75%. Assim, as análises de resíduos feitas na 13<sup>a</sup>, 26<sup>a</sup>, 39<sup>a</sup> e 52<sup>a</sup> semanas, foram superiores para a primeira dosagem, relativamente a segunda. As quantidades de resíduos foram 1,91; 1,89/1,77; 1,66; 1,51/1,42 e 1,74; 1,39/1,29; 1,25; 0,62/0,70 ppm, respectivamente. Esta superioridade numérica no primeiro caso, no entanto, pode estar associada à dosagem superior, com diferença de 0,12 ppm, em favor desta. Quando se aplicou a dosagem de 2,13 ppm, com temperatura de 25°C, 15% de umidade do grão e umidade relativa do ar de 73%, comparativamente com tratamento no qual se utilizou a dosagem de 2,01 ppm, com temperatura de 35°C, 12% de umidade do grão e umidade relativa do ar de 57%, verificaram-se novamente resíduos superiores para a dosagem maior, apesar dos percentuais mais elevados da umidade relativa do ar e umidade do grão. As quantidades de resíduos foram 1,91; 1,89/1,77; 1,66; 1,51/1,42; para a dosagem de 2,13 ppm e 1,83; 1,67/1,66; 1,38; 1,17/1,26; para a dose de 2,01 ppm.

HARGREAVES *et al.* (1982), citados por SNELSON (1987) no experimento que realizaram em grão armazenado de trigo, com Deltamethrina na formulação concentrado emulsionável, com a diluição para a aplicação feita em água e a temperatura e umidade do grão constantes, de 24°C e 12%, respectivamente, estabeleceram somente a variação das dosagens. Diferentemente de NOBLE *et al.* (1982), as análises de resíduos foram efetuadas ao zero, oito e 15 meses. As dosagens aplicadas foram 0; 125; 0,25; 0,3; 0,5; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 ppm. Todos os resultados obtidos demonstraram que, na medida em que a dosagem aumentou, o

resíduo também cresceu, em todas as análises. Portanto, a avaliação do trabalho demonstra que, sob condições estáveis de temperatura e umidade, a quantidade de resíduo será proporcional à dosagem aplicada, isto é, quanto maior a dosagem aplicada, maior a quantidade de resíduo detectado ao longo do tempo. Outra observação que pode ser feita é que na dosagem de 0,5 ppm, igual à dosagem utilizada, neste experimento, obteve-se aos zero, oito e 15 meses, 0,46/0,43; 0,41/0,45 e 0,46/0,47 ppm, respectivamente. Também, na dosagem de 0,3 ppm, próxima à dosagem de 0,35 ppm do experimento em questão, obteve-se aos zero, oito e 15 meses, 0,27/-; 0,27/0,26 e 0,29/0,29 ppm. Os resultados demonstram que, nas condições em que foi realizado o experimento, sob temperatura e umidade do grão controladas, a Deltamethrina não sofreu praticamente alteração ao longo do tempo.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado num dos laboratórios do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná, em Curitiba.

Utilizou-se de um termohigrógrafo, para a medição da temperatura e da U.R.(%) de forma simultânea, 24 horas por dia, durante o período de duração do experimento.

Para a obtenção das temperaturas médias mensais, foi utilizada a sistemática do Instituto Nacional de Meteorologia. Os períodos de leitura foram de agosto de 1992 a janeiro de 1993, abrangendo 181 dias.

Utilizou-se um luxímetro para a medição da intensidade luminosa. As mensurações foram feitas uma vez por semana às 9:00, 15:00 e 17:00 horas, com uma tolerância de mais ou menos 15 minutos, durante o período de duração do experimento. As leituras foram feitas por prateleira, em cada estante onde se encontravam as amostras. O total de leituras por estante, foi de quatro, resultando em 12 para as três estantes, em cada uma das horas anteriormente mencionadas.

Utilizaram-se, no experimento, 80 kg de milho semente fornecido pela empresa Cargill. O milho não sofreu qualquer tipo de tratamento químico com inseticidas ou fungicidas na origem. Estava embalado em 5 sacos de 20 kg de papel multifoldado duplo. Duas amostras de milho, de 1 kg cada, foram coletadas para confirmar a ausência de Malathion e Deltamethrina. O milho semente veio infestado com "caruncho" *Sitophilus* spp e "traça" *Ephestia cautella*. Para eliminar os insetos e facilitar o manuseio e armazenamento, reembalou-se o produto em sacos plásticos, com aproximadamente 4 kg cada, que foram estocados num "freezer" horizontal, a uma temperatura de -18°C. A permanência do material foi de 10 dias. Após a retirada constatou-se a morte de todos os insetos.

Foram utilizados dois inseticidas no experimento:

Malatol 1000CE, registrado no Ministério da Agricultura sob nº 004187-89, ingrediente ativo Malathion e K-Obiol 25 CE, registrado no Ministério da Agricultura sob nº 011483-88 ingrediente ativo Deltamethrina.

Para verificar se o Malathion e Deltamethrina encontravam-se dentro dos padrões químicos e físicos foi realizada análise no Instituto de Tecnologia do Paraná-Tecpar, confirmando a presença dos ingredientes ativos dentro dos níveis informados pelos fabricantes.

### **3.1. Delineamento experimental**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com três repetições. Foram testados três tratamentos de inseticidas (Tabela I) com avaliações da quantidade de resíduos em ppm dos ingredientes ativos aos 0, 15, 30, 60, 91, 120, 153 e 181 dias após a aplicação.

Cada bloco foi instalado em uma estante de aço, sendo cada unidade experimental formada por um frasco de vidro contendo 1kg de milho, o que resultou em 24 frascos por bloco.

Para certificação da ausência de contaminação entre frascos, foram colocados oito frascos sem inseticidas, distribuídos nos três blocos, que foram avaliados, um a cada período.

Tabela I. Tratamentos com as respectivas doses dos ingredientes ativos (i.a.) e dos produtos comerciais (p.c.) utilizados.

Tratamentos	Produto Comercial	i.a. (ppm)
Testemunha *	-	-
Deltamethrina 14 ml/t	K-Obiol 25 CE	0,35
Deltamethrina 20ml/t	K-Obiol 25 CE	0,50
Malathion	Malatol 1000 CE	20,00

### 3.2 . Análise estatística

Apesar do experimento indicar ser efetuada uma análise de variância com base em um esquema fatorial 3x8, referente aos três tratamentos com inseticidas e às oito épocas de avaliação, a mesma não foi realizada por ser inadequada, devido ao fato do Malathion e da Deltamethrina serem produtos distintos e, conseqüentemente, levarem a avaliação de variáveis diferentes (ppm de Malathion e ppm de Deltamethrina).

Assim, cada tratamento com inseticida foi estudado com base no cálculo da média, desvio padrão, amplitude da variação e histograma de freqüência dos resíduos.

Para a avaliação dos efeitos do tempo na degradação de cada inseticida, utilizou-se a técnica de análise de regressão.

### **3.3. Determinação do teor de umidade dos grãos**

Para cada amostra foram efetuadas duas repetições de 30 g de milho cada, colocando-se em latas numeradas com tampas, previamente pesadas em balança de precisão. Pesaram-se as latas com o milho ainda úmido. A seguir as mesmas foram levadas para a estufa, destampadas, permanecendo 24 horas a 105°C. Retiradas da estufa, foram tampadas, colocadas no dessecador e pesadas. Os valores obtidos foram aplicados à fórmula abaixo para cálculo do teor de umidade(TU%) em base úmida.

P - Peso da amostra úmida;

p - Peso da amostra seca;

TU% - Teor de umidade em base úmida.

$$TU(\%) = \frac{P - p}{p} \times 100$$

O teor de umidade utilizado neste trabalho corresponde a média aritmética das duas repetições determinados para cada amostra.

### **3.4 . Método analítico para determinação do Malathion (Método Multiresíduos)**

De cada amostra de 1 kg foram separados 300 g para a realização da respectiva análise. Deste total, retiraram-se 30 g. Posteriormente, realizou-se a extração com acetonitrila em garrafa de agitação ou mixer, seguindo-se a filtração em funil de Buchner, evaporando-se o excesso até cerca de 5 ml. Posteriormente fez-se partição líquido-líquido com 100 ml de água, 100 ml de solução

4/1EP(80)/Diclorometano (20), lavando-se por duas vezes a solução aquosa com a solução já referida. O solvente era recolhido e passado por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Caso houvesse emulsão usou-se isopropanol, evaporando-se até quase secura. Nesta fase, preparava-se a coluna cromatográfica com 10 g de florissil desativado, a 2%, diluído com éter de petróleo. Posteriormente, fizeram-se três diluições: a primeira, com 250 ml de solução 4/1EP(200)/diclorometano(50); a segunda, com 200 ml de solução 6/4EP(120)/diclorometano(80) e a terceira, 150 ml de diclorometano. Então recolheu-se cada eluato em copo separado, levando-se para evaporação, até quase à secura. Finalmente, passou-se com hexano para balão de 10 ml identificando em seguida, o ingrediente ativo em cromatógrafo gasoso através da detecção de Nitrogênio/fósforo.

### **3.5. Método analítico para determinação da Deltamethrina**

De cada amostra de 1 kg, foram separados 300 g, para a realização da respectiva análise. Deste total, retiraram-se 30 g. Paralelamente, foram pesadas 5 g de celite (Kieselgur) e 10g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Os 30 g sofreram trituração, sendo adicionados 200 ml de acetonitrila, juntamente com os dois elementos químicos anteriormente mencionados, Agitando-se por duas horas em garrafa de agitação. Após, houve a filtragem através de funil de Buchner, evaporando-se o filtrado até cerca de 30 ml, transferindo-se o extrato para funil de separação de 125 ml. Em seqüência, extraiu-se por duas vezes, com solução composta de 16 ml de éter de petróleo e 4 ml de acetonitrila, totalizando 20 ml. Em ambas as vezes, descartou-se a fase superior, recolhendo-se a fase inferior da segunda extração, em outro funil de separação de 500 ml. Junto com o extrato colocaram-se, 50 ml de água mineral, 5 ml de NaCl solução saturada, 50 ml da mistura (1:1) de éter de petróleo e de éter etílico. Agitando-se fortemente, repousando em seguida, passando a fase etérea por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro e reextraiu-se, então, a fase aquosa com mais 50 ml da mistura éter de petróleo/éter

etílico (1:1). Descartando-se a água passou-se à fase etérea por  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. Este extrato foi evaporado até cerca de 10ml. Preparou-se uma coluna com 5g de florasil com 5% de umidade entre duas camadas de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro. A coluna foi pré-umidecida com éter de petróleo. Passaram-se 20 ml da solução em 5ml de éter de petróleo e 15 ml de éter etílico. Prosseguindo, passou-se em 10 ml de éter de petróleo, eluindo a coluna com 250 ml da mistura éter de petróleo (200 ml), mais éter etílico (50 ml). O extrato recolhido foi levado para evaporar até quase à secura. O resíduo foi passado com isoctano para um balão de 5 ou 10 ml e encaminhado para a cromatografia, identificando-se o ingrediente ativo em cromatógrafo gasoso para captura de elétrons.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As médias dos três tratamentos com inseticidas em cada época de avaliação estão apresentados na Tabela II.

Tabela II. Médias por época de avaliação para Malathion (20 ppm) e Deltamethrina (0,35 e 0,50 ppm).

Dias após aplicação	TRATAMENTO		
	MALATHION	DELTAMETHRINA	DELTAMETHRINA
	20 ppm	0,35 ppm	0.50 ppm
0	3,46	0,12	0,27
15	3,53	0,19	0,19
30	3,53	0,22	0,32
60	2,76	0,17	0,21
91	4,66	0,24	0,15
120	4,86	0,18	0,22
153	3,66	0,01	0,08
181	3,02	0,17	0,10

Os valores da média, desvio padrão e amplitude de variação dos resíduos de cada tratamento estão presentes na Tabela III.

Tabela III. Média, desvio padrão e amplitude das amostras de Malathion (20 ppm) e Deltamethrina (0,35 e 0,50 ppm).

	TRATAMENTO		
	MALATHION	DELTAMETHRINA	DELTAMETHRINA
	20,0 ppm	0,35 ppm	0,50 ppm
MÉDIAS	3,69	0,166	0,192
DESVIO PADRÃO	1,06	0,086	0,090
AMPLITUDE	5,62	0,34	0,33

As equações para estimativa da degradação do Malathion (20 ppm) e Deltamethrina (0,35 e 0,50 ppm), com os respectivos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e os testes F encontram-se na Tabela IV.

Tabela IV. Equações para estimativas da degradação de Malathion (20 ppm) e Deltamethrina (0,35 e 0,50) e respectivos coeficientes de determinação e os testes "F".

TRATAMENTOS	EQUAÇÕES	$R^2$	TESTE F	P>F
MALATHION 20 ppm	$Y1=3,57+0,00139D$	0,01	0,15	0,70
DELTAMETHRINA 0,50 ppm	$Y2=0,27-0,00098D$	0,43	16,75	0,0005
DELTAMETHRINA 0,35 ppm	$Y3=0,19-0,00033D$	0,06	1,4	0,24

As equações de regressão apresentadas na Tabela IV indicam que não existe redução significativa dos resíduos de Malathion 20 ppm e que ocorre redução significativa para Deltamethrina 0,35 e 0,50 ppm, sendo que para esta verifica-se numa intensidade maior. Isto também pode ser observado nas Figuras 5 e 7.



#### 4.1. Malathion

A Tabela V apresenta os resultados de cada repetição e médias relativos à degradação do Malathion, durante o período do experimento.

Tabela V. Resíduos de Malathion em cada repetição e médias em milho armazenado a granel, durante 181 dias.

Dias após aplicação	Resíduos nas repetições (ppm)			Media (ppm)
0	3,20	3,52	3,67	3,46
15	3,65	3,17	3,78	3,53
30	4,39	3,35	2,85	3,53
60	4,20	0,00	4,08	2,76
91	5,62	4,20	4,18	4,66
120	5,21	4,41	4,96	4,86
153	3,31	3,96	3,71	3,66
181	3,34	2,77	2,96	3,02

Observa-se que a recuperação foi bastante inferior à dosagem utilizada (20 ppm) ao zero dia. Diversos fatores podem ter contribuído para este baixo nível de recuperação:

- perdas durante o processo de extração do ingrediente ativo;
- perdas por volatilização ou hidrólise, quando da pulverização e manipulação das amostras.

#### 4.1.1. Degradação do Malathion, pela temperatura, U. R.(%), umidade do grão, luminosidade e presença de microorganismos fúngicos

As freqüências das quantidades de resíduo de Malathion em ppm verificado nas amostras encontram-se na Figura 1.

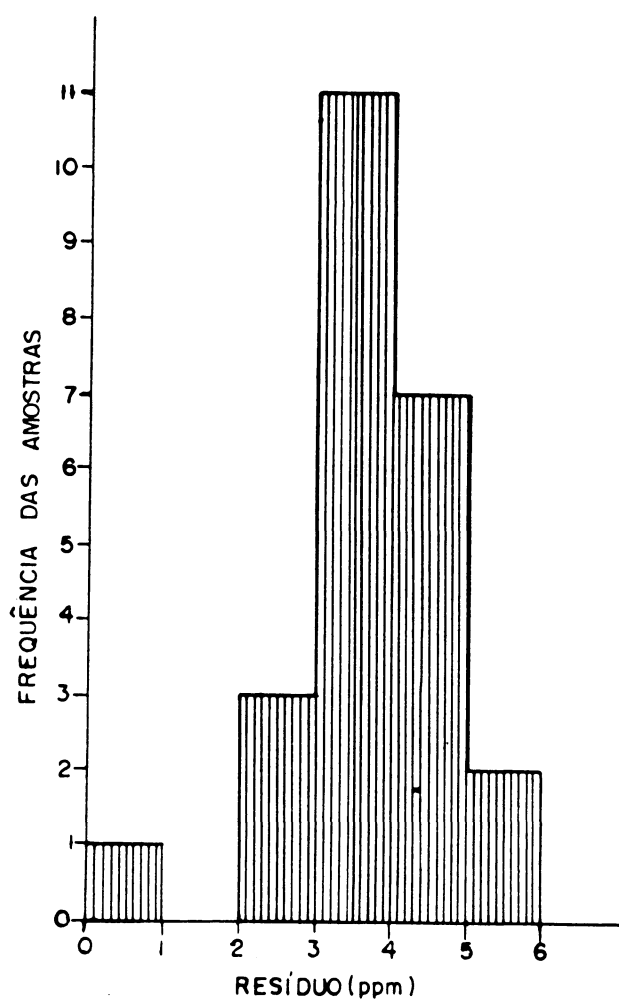


Figura 1. Frequência das amostras que apresentaram resíduos de Malathion em ppm.

Observa-se que, no intervalo de 3-5 ppm, ocorrem 18 amostras, o que representa 75% do total.

Analisando-se a Figura 2 e a equação de regressão da degradação do ingrediente ativo ao longo do tempo, apresentada na Tabela IV, verifica-se que dentro do período de realização do experimento, o Malathion tendeu para a estabilidade.

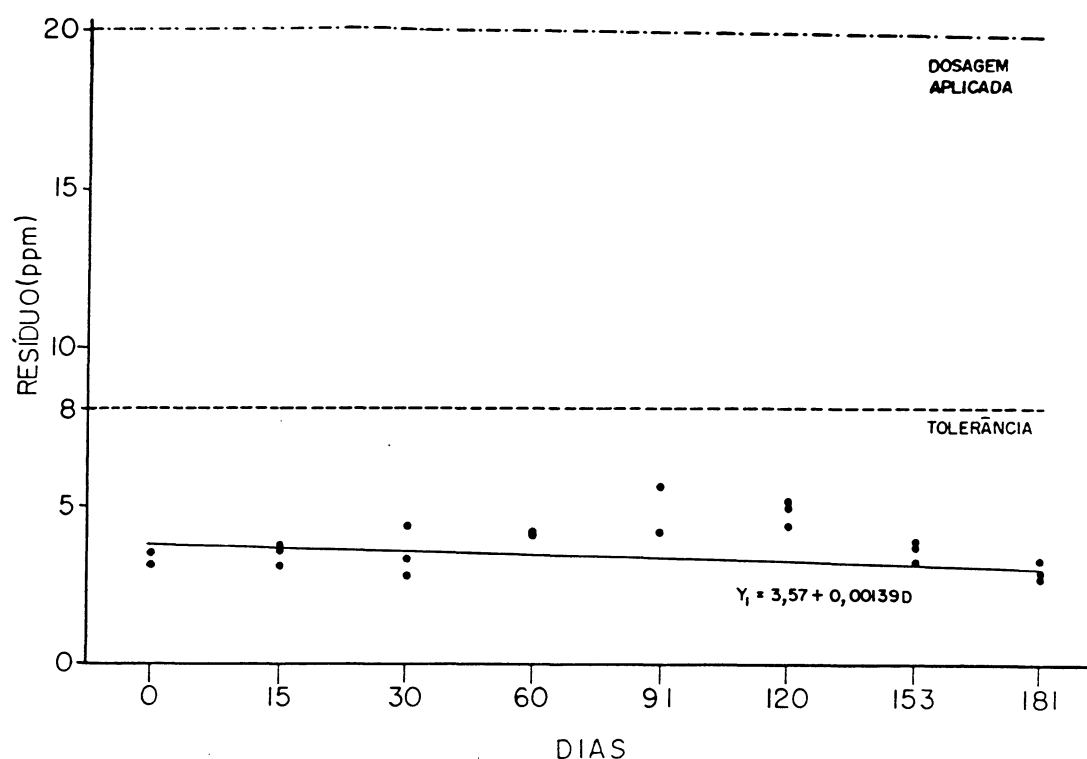


Figura 2. Degradação do Malathion em ppm num período de 181 dias.

#### 4.1.1.1. Degradação do Malathion pela temperatura e U.R.(%)

Observando-se a Tabela VI e Figura 3, durante os seis meses da realização do experimento, a temperatura no período compreendendo os 30 primeiros dias, foi de 16,4°C, crescendo gradativamente até o período entre 153 e 181 dias, alcançando 26,5°C, com uma variação positiva de 10,1°C.

A U.R.(%) apresentou médias decrescentes, nos 30 primeiros dias foi de 69,2% e no período entre 153 e 181 dias foi de 59,4%, com uma variação de 9,7%.

Tabela VI. Médias das temperaturas (T), umidade relativa U.R.(%), umidade do grão tratado (U.G.Tr), Umidade do grão testemunha (U.G.Te) e Intensidade de luz (I.L) medidas durante o experimento.

Dias após o tratamento	T (C)	U.R. (%)	U.G.Tr. (%)	U.G.Te. (%)	I.L.	
					Lux	W/m2
30	16,4	69,2	11,7	11,1	1,17	0,0117
60	18,9	69,5	11,7	11,5	2,10	0,0210
91	22,3	66,2	11,5	11,1	4,88	0,0488
120	22,2	59,8	11,0	10,9	3,95	0,0395
153	24,8	58,0	10,9	11,1	8,14	0,0814
181	26,5	59,4	11,0	11,1	8,30	0,0830

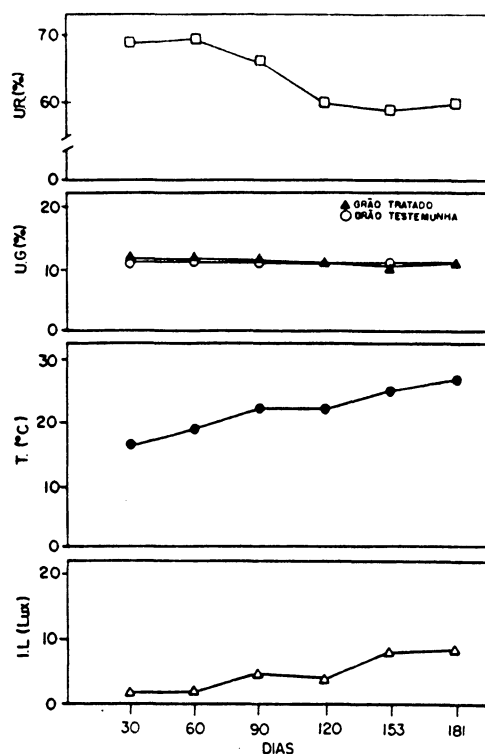


Figura 3. Temperatura (T), umidade relativa (U.R.), umidade do grão tratado (U.G.Tr.), umidade do grão testemunha (U.G.Te.) e intensidade de luz (I.L.) verificados durante o período do experimento.

Analisando-se a Figura 2, que apresenta o gráfico de tendência, verifica-se a estabilidade do Malathion ao longo do experimento. Numericamente, no entanto, a partir dos 153 dias ocorreu o aumento da temperatura média, com decréscimo do resíduo, em cinco das seis amostras pertinentes aos períodos .

Os resultados obtidos foram compatíveis com as observações de ABDEL-KADER *et al.* (1980) e WINTERSTEEN & FOSTER (1992) os quais demonstraram haver degradação mais acentuada de Malathion, em temperaturas mais elevadas. Observa-se portanto que existe relação direta entre degradação do Malathion e a elevação da temperatura.

O tempo de armazenamento do milho, cinco meses antes da realização do experimento, não pôde ser afirmativa ou negativamente referido como tendo interferido na degradação inicial mais elevada.

Quanto à UR(%), as referências encontradas na literatura, relativas à sua interferência na degradação foram limitadas. No entanto, pode-se argumentar, que em temperaturas menos elevadas e com U.R.(%) alta, a hidrólise contribui para a degradação do ingrediente ativo. Da mesma forma que para a temperatura, não é possível estabelecer um peso exato da importância da U.R.(%) na degradação. Provavelmente, será inferior à importância da temperatura no processo.

#### **4.1.1.2. Degradação do Malathion em consequência do teor de umidade do grão**

As médias dos teores de umidade das amostras apresentaram pequena variação, do começo ao final do experimento. A umidade foi de 11,7% a 10,9%, com uma variação no período de 0,8%. As “amostras testemunha”, apresentaram valores menores do que as tratadas, nos primeiros três meses do experimento. Isto é explicado em função da água ter sido o veículo utilizado na pulverização e ter contribuído para o aumento do teor de umidade dos grãos.

Comparando-se com o trabalho de STRONG & SBUR (1960) e QUILAN (1982) citado por STOREY (1982), verifica-se que os níveis de umidade do grão no experimento realizado, estiveram sempre abaixo de 12%, variando de 10,9 a 11,7, faixa esta considerada segura para se garantir a eficiência máxima do ingrediente ativo, que está diretamente relacionada com a sua estabilidade e a quantidade de resíduo. Existe uma interrelação entre os diversos fatores que podem interferir na degradação de um ingrediente ativo. STRONG & SBUR (1960), demonstraram que o

aumento da degradação ocorre com o aumento da temperatura e da umidade do grão que também, influem favoravelmente no desenvolvimento fúngico. Resíduos de Malathion em grãos armazenados de trigo em 32,2°C e 14% de umidade, degradaram-se mais rapidamente do que os resíduos em grãos de trigo armazenados a 32,2°C e 12% de umidade ou 15,5°C e 14% de umidade.

Portanto, devido ao baixo teor de umidade dos grãos ao longo do experimento, provavelmente, este fator isoladamente teve pouca influência na degradação do Malathion.

#### **4.1.1.3. Degradação do Malathion pela luminosidade**

Analisando-se os valores medidos mensalmente da luz incidente observaram-se níveis bastante baixos nos 30 primeiros dias, com média de leitura de 1,17 lux ou 0,0117 watts/m<sup>2</sup>, enquanto que no período entre 153 e 181 dias, a média das leituras foi de 8,30 lux ou 0,083 watts/m<sup>2</sup>, com uma diferença de 7,13 lux ou 0,0713 watts/m<sup>2</sup>. Este aumento da intensidade de luz ocorreu devido a oscilação anual que normalmente é verificada. O experimento teve início no inverno, desenvolveu-se por toda a primavera e terminou no verão. Tanto a fotofase, como a intensidade de luz são bastante diferenciados, em cada uma das estações mencionadas. De todos os trabalhos consultados, apenas, GUNTER & BLINN (1956), mencionaram terem trabalhado no escuro. Para os demais, fica a dúvida, relativamente à intensidade de luz, no local do experimento.

Os raios ultravioleta que segundo COOK (1955), COOK & OTTES (1959) e MITCHELL (1961) poderiam degradar o Malathion, possivelmente não incidiram sobre as amostras do experimento ou incidiram em quantidades muito baixas, não interferindo ou interferindo pouco na degradação.

#### 4.1.1.4. Degradação do Malathion por microorganismos fúngicos

Visando detectar-se a presença de fungos e procurar avaliar a sua interferência na degradação, foram realizados plaqueamento do milho em três meios de cultura, MAST, MBDA e BLOTTER. Os resultados obtidos em cada tratamento e entre os meios de cultura, serão abordados na Parte II. Neste item, no entanto, será tratada a presença de fungos interferindo na degradação do Malathion.

Foi observada a presença dos seguintes gêneros no milho tratado com Malathion: *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Cephalosporium* spp. e *Cladosporium* spp..

Diversos estudos evidenciam a importância destes microorganismos na degradação de Malathion.

Como ficou demonstrado por LEWIS *et al.* (1975), citado na Micro-Ficha da Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos nº EPA/600/X-8/328 fungo do gênero *Aspergillus* spp. degrada o Malathion. A presença portanto deste fungo nas amostras, indica que o microorganismo pode ter interferido na degradação do ingrediente ativo. Para os outros fungos identificados no experimento não se encontrou menção de ação sobre o Malathion, podendo no entanto terem interferido na degradação.

Como o experimento foi desenvolvido nas condições ambientes, os demais fatores, temperatura, U.R.(%), umidade dos grãos e a luminosidade, interagindo com os fungos, podem ter levado a gradativa degradação do ingrediente ativo. Este fato pode estar expresso, através das diferenças numéricas verificadas nos resultados de resíduos, se analisados individualmente. Estas diferenças numéricas podem ter origem também na pulverização do material que pode ter ocorrido de forma não uniforme; na



homogeneização do material; através das perdas no processo analítico; nas perdas por volatilização ou hidrólise. Não ficou evidenciada entretanto, a interferência dos fungos na degradação do Malathion, de forma que pudesse ser identificado gráfica ou estatisticamente.

## 4.2. Deltamethrina

### 4.2.1. Degradação da Deltamethrina pela temperatura, U.R.(%), umidade do grão, luminosidade e presença de microorganismos fúngicos

A Tabela VII menciona os dados obtidos ao longo do experimento, relativamente à Deltamethrina.

Tabela VII. Valores dos resíduos de Deltamethrina, dosagens de 14 e 20 ml/t, para milho à granel em três repetições (ppm).

Dias após aplicação	Deltamethrina 20 ml/t			Média ppm	Deltamethrina 14 ml/t			Média ppm
0	0,240	0,340	0,240	0,27	0,190	0,180	0,000	0,12
15	0,220	0,120	0,250	0,19	0,19	0,270	0,130	0,19
30	0,340	0,340	0,300	0,32	0,170	0,220	0,270	0,22
60	0,170	0,210	0,270	0,21	0,180	0,140	0,200	0,17
91	0,160	0,090	0,200	0,15	0,260	0,140	0,330	0,24
120	0,240	0,200	0,220	0,22	0,130	0,230	0,190	0,18
153	0,230	0,020	0,000	0,08	0,000	0,020	0,020	0,01
181	0,147	0,101	0,0603	0,1	0,109	0,192	0,214	0,17

A frequência com que foram verificadas as quantidades de Deltamethrina dosagem 20 ml/t encontram-se na Figura 4.

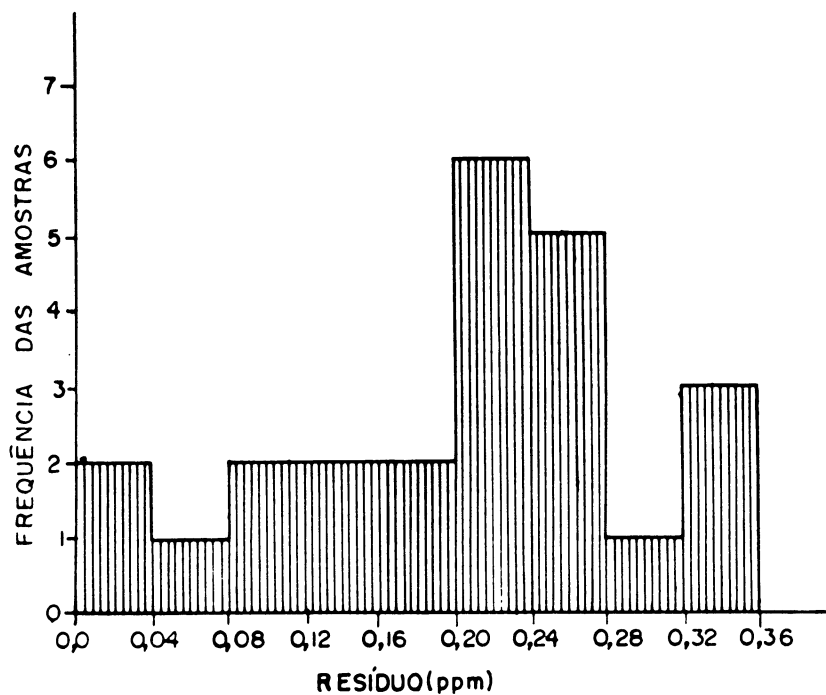


Figura 4. Freqüência das amostras que apresentaram resíduos de Deltamethrina na dosagem de 20 ml/t.

Observa-se pela Figura 4 que houve pouca uniformidade na distribuição dos dados e que os dois intervalos com a maior freqüência foram 0.20-0.24 e 0.24-0.28, com apenas 11 amostras(46%). Na Figura 5 observa-se diferenciação dos resultados tanto nas mesmas datas de coleta, como em datas diferentes. No entanto, as variações na quantidade de resíduo, não possuem tendência significativa de queda ao longo do tempo, como demonstram a Figura 5 e Tabela IV.

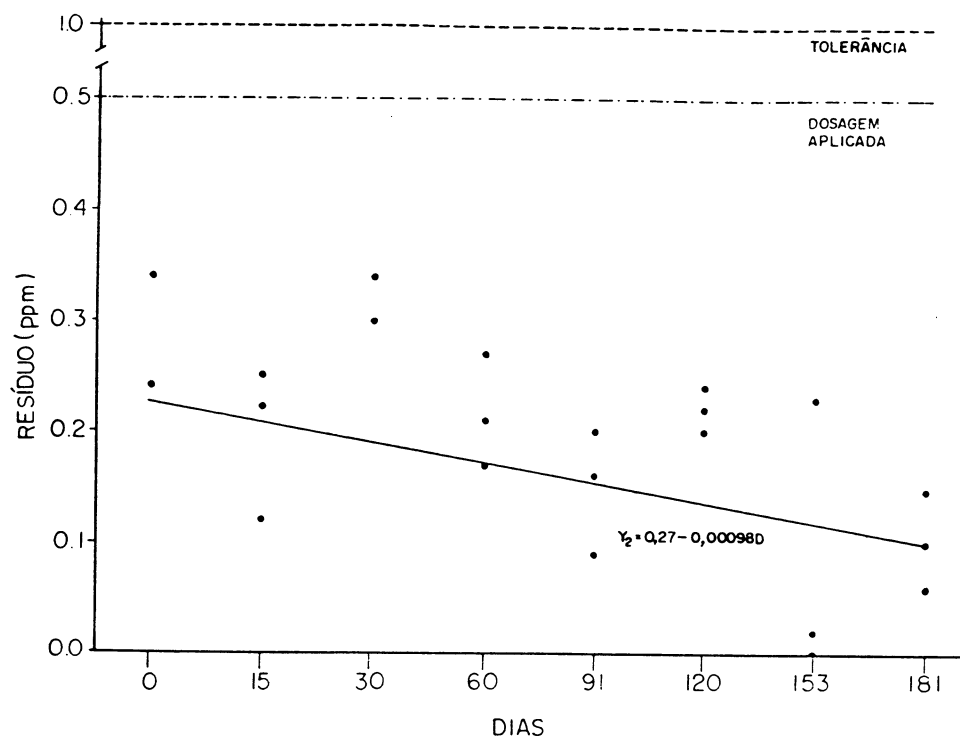


Figura 5. Degradação de Deltamethrina na dosagem de 20ml/t num período de 181 dias.

A frequência com que foram observadas as quantidades de Deltamethrina dosagem de 14 ml/t, encontram-se na Figura 6. Os intervalos em que se encontraram um maior número de resultados foram 0,12 e 0,24 ppm, com 15 amostras.

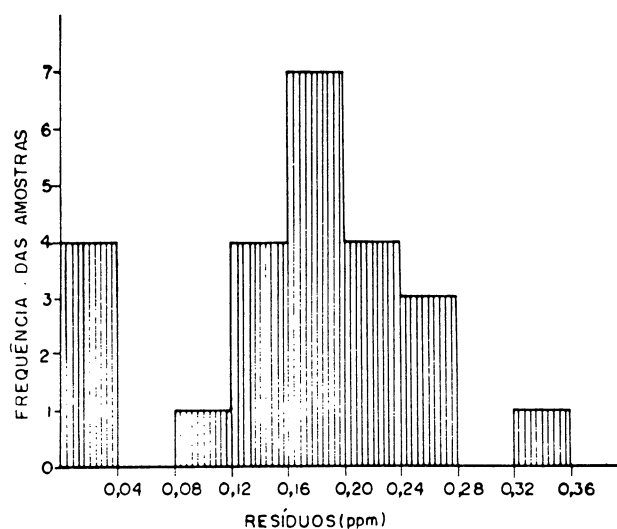


Figura 6. Frequência das amostras que apresentaram resíduos da Deltamethrina na dosagem de 14 ml/t.

Analisando-se a Figura 7 e a equação de regressão da Tabela IV verificam-se que as variações ocorridas na quantidade de resíduo detectada não possuem tendência significativa de queda ao longo do tempo.

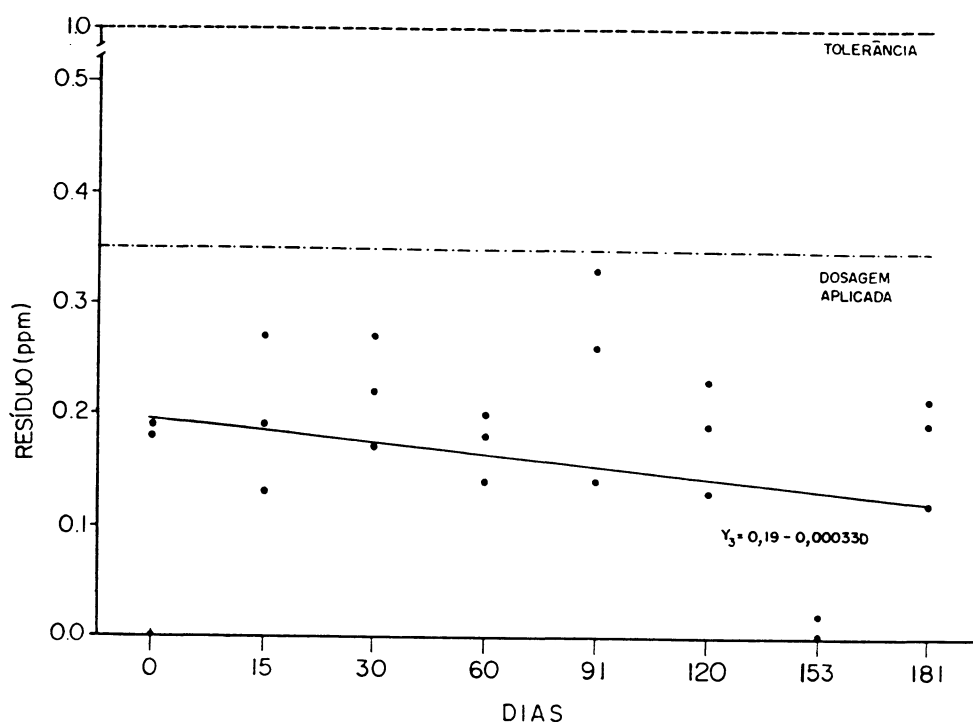


Figura 7. Degradação de Deltamethrina na dosagem de 14 ml/t num período de 181 dias.

#### 4.2.1.1. Degradação da Deltamethrina pela temperatura, U.R.(%), teor de umidade do grão e luminosidade

Como ficou demonstrado na Tabela VI e Figura 3, durante os seis meses da realização do experimento, a temperatura no período compreendendo os 30 primeiros dias foi de 16,4°C, aumentando gradativamente até o período entre 153 e 181 dias, alcançando 26,5°C. Portanto, com amplitude de 10,1.

No experimento em questão, as condições ambientais variaram uniformemente na unidade experimental para os três blocos. Assim os fatores que efetivamente se diferenciaram foram as doses dos tratamentos, 0,35 ppm e 0,50 ppm. Dentro deste contexto, verificaram-se valores numericamente menores para a dosagem menor, similarmente ao trabalho de NOBLE *et al.* (1982). Comparando os resultados do experimento de NOBLE *et al.* (1982), citado por SNELSON (1987), no qual diversas dosagens variaram conjuntamente com a temperatura, a U.R.(%) e a umidade do grão, verifica-se a ocorrência de maior degradação, do que no experimento de HARGREAVES *et al.* (1982), citados por SNELSON, que possuía temperatura e umidade do grão controlada e constante.

Assim, evidenciando-se, as variações e interações entre a temperatura, a U.R.(%) e a umidade dos grãos, que podem contribuir para a maior degradação da Deltamethrina.

O aumento da temperatura e o decréscimo da U.R.(%) e da umidade dos grãos, pode ser responsável pela variação numérica detectada nos valores de diversas amostras. A gradativa degradação da quantidade detectada de resíduos é estatisticamente não significativa, como demonstram as Figuras 5 e 7. No entanto, não se pode descartar que as variações numéricas detectadas nos valores de diversas amostras, podem ter origem em outros fatores como:

- quando da pulverização do material tratado, ter ocorrido deposição da calda de forma não uniforme;

- posteriormente a pulverização, a homogeneização do material, para a formação das amostras, ter propiciado quantidades diferentes do ingrediente ativo em cada amostra;

- perdas durante o processo de extração do ingrediente ativo, detectando-se quantidades efetivamente inferiores às aquelas existentes no material;

- perdas por hidrólise, quando da pulverização e manipulação das amostras em laboratório.

Quanto à umidade do grão, relativamente à degradação de Deltamethrina, como demonstra a Tabela VI, esteve sempre abaixo de 12%, valor utilizado por HARGREAVES *et al.* (1982), citados por SNELSON (1987), e que garantiu como já foi demonstrado, grande estabilidade para o ingrediente ativo e em consequência, provavelmente, não contribuindo de forma significativa para a degradação.

Quanto à luminosidade, relativamente a degradação de Deltamethrina, os valores medidos mensalmente da luz incidente na unidade experimental, observam-se índices bastante baixos. No período compreendendo os 30 primeiros dias, a média das leituras foi de 1,17 Lux ou 0,0117 Watts/m<sup>2</sup>, no período que foi dos 153 aos 181 dias, a média das leituras foi de 8,30 Lux ou 0,0713 watts/m<sup>2</sup>. É evidente o aumento da intensidade de luz à medida que o tempo passou. Isto explica-se em decorrência de que, o experimento teve seu início no inverno, desenvolveu-se por toda a primavera e findou no verão. Tanto a fotofase, como a intensidade de luz, são bastante diferenciados, em cada uma das estações medidas.

De acordo com WHO (1990), a Deltamethrina é estável à luz e calor, sendo instável em meio alcalino.

Portanto, face a baixa detecção evidenciada e a estabilidade do ingrediente ativo a luz, possivelmente esta não interferiu na degradação da Deltamethrina.

NOBEL *et al.* (1982), citados por SNELSON (1987), mencionaram que levando-se em conta resultados de seu próprio laboratório, os piretróides grupo a que

pertence a Deltamethrina, usada em pós-colheita, tem como característica, a permanência de grande quantidade de inseticida fora do grão ou em suas camadas exteriores. Isto sugere que grandes quantidades podem ser degradadas não pela ação de enzimas, mas sim, por reações oxidativas e por processos de hidrólise, podendo ser mais importantes em sistemas onde existe ausência total de luz.

#### **4.2.1.2. Degradação da Deltamethrina por microorganismos fúngicos**

Visando detectar a presença de fungos e avaliar a interferência na degradação do ingrediente ativo, foram realizadas para todas as amostras, testes para detecção através dos meios BLOTTER, MAST e MBDA. Os resultados obtidos para cada tratamento, meios e respectivas diferenças, serão apresentados na Parte II. Neste item, será tratada da presença de fungos interferindo na degradação de Deltamethrina.

Ao longo de todo o experimento observou-se a presença de fungos nos tratamentos da Deltamethrina dosagem 20 ml/t e 14 ml/t. Os fungos detectados foram *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp, *Penicillium* spp., *Cephalosporium* spp. e *Cladosporium* spp.. Não ficou evidenciada a interferência de nenhum destes fungos na degradação da Deltamethrina, já que os fatores responsáveis pela degradação, temperatura, U.R.(%), umidade do grão, luminosidade e fungos atuaram de forma conjunta, não havendo preponderância dos fungos relativamente aos outros fatores.

## 5. CONCLUSÕES

A partir das análises dos resultados obtidos conclui-se:

5.1. Os tratamentos com Malathion, Deltamethrina dosagem de 14 ml/t e 20 ml/t, apresentaram tendência de redução do resíduo, sendo estatisticamente não significativo para o Malathion e significativo para a Deltamethrina em ambas as dosagens;

5.2. A temperatura, dependendo do nível, exerce importante ação na degradação do Malathion. A U.R.(%), nos níveis observados, pode ter contribuído para a degradação do Malathion;

5.3. Nos níveis em que foram observadas possivelmente a umidade do grão e a luminosidade não contribuíram para a degradação do Malathion;

5.4. Microorganismos fúngicos podem degradar o Malathion, entretanto, a umidade dos grãos esteve sempre abaixo de 12%, o que não possibilitou seu desenvolvimento, não detectando-se ação sobre o ingrediente ativo;

5.5. Nos níveis observados a temperatura e U.R.(%), podem ter contribuído para a degradação da Deltamethrina;

5.6. No experimento, a umidade dos grãos esteve sempre abaixo de 12%. Neste nível verifica-se a estabilidade da Deltamethrina, desde que as temperaturas de armazenamento sejam adequadas;

5.7. A umidade dos grãos sempre abaixo de 12%, não possibilitou o desenvolvimento fúngico e sua ação sobre a Deltamethrina não pode ser detectada;



5.8. A luminosidade incidente sob o local do experimento, possivelmente, não interferiu na degradação da Deltamethrina, face a baixa detecção evidenciada e a estabilidade do ingrediente ativo a luz;

5.9. Nas condições do experimento para a temperatura, U.R.(%) e umidade do grão verificadas, a quantidade de Deltamethrina detectada, será proporcional à dosagem aplicada, isto é, quanto maior a dosagem, maior a quantidade de resíduo observado ao longo do tempo.

## 6. SUGESTÕES

De acordo com os resultados obtidos, sugere-se o desenvolvimento dos seguintes trabalhos:

6.1. Realizar-se a nível de silos e armazéns, estudo similar ao presente trabalho, com a finalidade de verificar o perfil de degradação dos ingredientes ativos Malathion e Deltamethrina nas condições de recomendação e uso rotineira destes ingredientes ativos;

6.2. Realizar a nível de laboratório, armazéns e silos, estudos com outros ingredientes ativos passíveis de serem recomendados para tratamento de grãos, visando estabelecer o perfil de degradação nas condições locais do Paraná e do Brasil.

## 7. REFERÊNCIAS CITADAS

ABDEL-KADER, M.H.K.; G.R.B. WEBSTER; S.R. LOSCHIAVO & F.L. WATTERS (1980). Low-Temperature Degradation of Malathion in Stored Wheat. **J. Econ. Entomol.** **73**: 654-656p.

ANDEREGG B.N. & J. MADISEN (1983). Effect of Inseticide Distribution and Storage Time on the Degradation of [C14] Malathion in Store Wheat. **J. Econ. Entomol.** **76**: 1009-1013p.

CODEX ALIMENTARIUS; FAO & WHO (1986). **Codex Maximum Limits for Pesticide Residues**. FAO/WHO, Italy.

COG BURN, R.R.; R.A. SIMONAITIS & B.D. WEBB (1990). Fate of Malathion and Chlorpyrifos Methyl in Rough Rice and Milling Fractions Before and After Paraboiling and Cooking. **J. Econ. Entomol.** **83**: 1636-1639p.

EPA (1993). EPA/600/X-84/328. **Environmental Criteria and Assessment Office**. Cincinnati, Environmental Protection Agency, 93p.

FAO (1986). **Guidelines on Pesticide Residue Trials to Provide Data for the Registration of Pesticides and Establishment of Maximum Residue Limits**. FAO, Roma, VI+40p.

GUNTHER F.A. & R.C. BLINN (1956). Persisting Inseticide Residues in Plant Materials. **An. Rev. Entomol.** **1**: 167-180p.

SNELSON, J.T. (1987). Grain Protectants. Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra, X+448p.

- STRONG, R.G. & .E. SBUR (1960). Influence of Grain Moisture and Storage Temperature on Effectiveness of Malathion as a Grain Protectant. **J. Econ. Entomol.** **53**: 341-349p.
- STOREY, C.L.(1982). **Corn: Chemistry and Technology**. Effect and Control of Insects Affecting Corn Quality. S.A. Watson e P.E. Ramstad., 123p.
- UNEP; FAO & WHO (1988). **Assessment of Chemical Contaminants in Food**. Report on the Results of the UNEP/FAO/WHO Programme on Health-related Environmental Monitoring. Monitoring and Assessment Research Centre, London, IV+104p.
- WHO (1990). **Environmental Health Criteria 97-Deltamethrin**. Geneva, World Health Organization, 133p.
- WINTERSTEEN, W.K. & D.E.FOSTER (1992). Degradation of Malathion as a Function of Grain Drying Systems. **J. Econ. Entomol.** **85**: 1015-1022p.

## **PARTE II**

### ***COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS EM GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO***

**RESUMO**  
**COMPARAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE FUNGOS EM**  
**GRÃOS DE MILHO ARMAZENADO**

A importância de se medir o nível de infecção por microorganismos em sementes e grãos armazenados exige o uso de diversos meios de cultura. O uso de meios de cultura para o crescimento de fungos é fundamental para isolamento e posterior identificação desses organismos. Neste estudo foram utilizadas 80 amostras de milho de 1 kg cada, sendo 24 tratadas com Malathion, 48 com Deltamethrina e 8 sem tratamento. Para cada amostra, foram analisadas 200 sementes pelo método de Blotter e 120 sementes pelos métodos de plaqueamento em meio de Agar de Suco de Tomate (MAST) e em meio de Batata Dextrose-Agar (MBDA). O Blotter percentualmente detectou mais *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* e menos *Fusarium spp.*. O MBDA foi superior ao Blotter e ao MAST na detecção de *Fusarium spp.*. O MAST foi superior ao Blotter na detecção de *Fusarium spp.*, enquanto que, para *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* este meio apresentou resultado similar ao MBDA e inferior ao Blotter. O uso de vários métodos é a melhor maneira para o isolamento e identificação de fungos de campo e de armazenamento em milho. Os tratamentos com Malathion e Deltamethrina não interferiram nos níveis de infecção dos fungos nos três métodos.

**SUMMARY**  
**COMPARISON OF METHODS FOR FUNGI DETECTION IN STORED**  
**CORN**

The use of suitable methods for assessment of microorganisms in stored seeds and grains, are very important. The use of different media for fungi isolation in laboratory is very important for their correct identification. In this study 24 samples treated with Malathion, 48 with Deltamethrin and 8 without treatment were used. Two hundred seeds were analyzed by the Blotter test and 120 were plated on Tomato Juice Agar Medium (MAST) and Potato-Dextrose Agar Medium (MBDA).

The Blotter test detected more *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* and few *Fusarium spp.*. The MBDA demonstrated to be superior than the Blotter test and the MAST for the detection of *Fusarium spp.*. For *Aspergillus spp.* and *Penicillium spp.* the MAST and MBDA presented similar results. The combination of several media is the better way for isolation and identification of field and storage fungi in stored corn.

## 1. INTRODUÇÃO

Os danos causados pelos microorganismos na quantidade e qualidade das sementes e grãos, durante o seu crescimento, maturação, colheita e armazenamento são altamente variáveis e estimativas mais precisas são difíceis de obter. Segundo NEERGAARD (1977), a FAO estima em 5% as perdas de todos os alimentos produzidos no mundo, em forma de grãos, do período da colheita até o consumo. Os fungos de campo e de armazenamento são responsáveis por parcela significativa destas perdas. Estas podem ser de até 30% ou mais, se for considerado um sistema específico de exploração ou um dado tipo de estrutura de armazenamento, país em particular ou uma região. A estimativa destas perdas, principalmente no caso de sementes e grãos é um fato bastante complexo, pela falta de estudos neste campo e pela dificuldade de se coletar informações. Esta realidade determina a execução de estudos visando aprimorarem-se as técnicas ou os métodos de detecção destes microorganismos durante o armazenamento de sementes e grãos.

Somente com metodologias comprovadamente eficientes, pode-se detectar, isolar, identificar e quantificar os fungos existentes, em determinada porção de sementes ou grãos. Identificações imprecisas podem provocar perdas econômicas e/ou danos a saúde humana e animal de forma significativa. Em um espaço relativamente curto de tempo, certos fungos produtores de micotoxinas podem infectar sementes e grãos e causarem graves consequências, aqueles que consumirem o produto ou subproduto (CHRISTENSEN & KAUFMANN, 1969); (CHRISTENSEN & MERONUCK, 1986); (HOCKING & PITT, 1993).

Os fungos, associados às sementes e grãos, são dependentes do teor de umidade do produto e das condições ambientais do armazém para crescerem. Caso as condições de armazenagem sejam precárias, pode ocorrer o crescimento extensivo



destes organismos no produto estocado, comprometendo sua germinação e ocasionando alterações significativas na qualidade ( CHRISTENSEN, 1972).

As sementes e grãos armazenados podem manter suas características físicas, sanitárias e nutricionais asseguradas por longos períodos, quando técnicas adequadas de secagem, aeração, termometria e controle de insetos e fungos forem adotadas.

O objetivo deste trabalho foi o de comparar o nível de eficiência de três métodos na detecção de fungos em milho armazenado.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

MACHADO (1987), comenta que a associação de patógenos com as sementes é preocupação antiga do ponto de vista da Fitopatologia.

CHRISTENSEN & MERONUCK (1986) e LÁZZARI (1993), enfatizam que, a manutenção da qualidade das sementes, dos grãos e das rações, requer um bom armazenamento, o que significa muito mais, do que encher o silo ou armazém. O cuidado e conhecimento de suas condições sanitárias até ser usado ou comercializado é muito importante. A não ser que sejam tomadas medidas preventivas para o controle de fungos, insetos, ácaros, ratos e pássaros, todos eles, lenta ou rapidamente, reduzem a qualidade e a quantidade do produto armazenado.

CHRISTENSEN (1969) classifica, os fungos que atacam as sementes ou grãos como, fungos de campo e de armazenamento. De campo são aqueles que atacam a semente ou o grão antes da colheita, isto é, durante o período do crescimento ou maturação. A maioria dos fungos de campo, que infectam os produtos agrícolas antes da colheita, necessitam para seu crescimento de um teor de umidade que está em equilíbrio com a umidade relativa em torno de 90-95%. Em sementes amiláceas isto significa um teor de umidade da semente ao redor de 25%, na base úmida. O crescimento destes fungos é inibido principalmente devido ao decréscimo do teor de umidade da semente ou do grão após a colheita e secagem do produto.

Depois das sementes serem colhidas e armazenadas, estão sujeitas a invasão e/ou injúria por um grupo de fungos designados como fungos de armazenamento. Estes fungos, principalmente dos gêneros *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*, são aptos para crescer em ambientes com baixa umidade, podendo se desenvolver em materiais cujo conteúdo de umidade esteja em equilíbrio com a umidade relativa de 65 a 90%. WETZEL (1987) considerando diferentes espécies em

um mesmo gênero, observou que possuem um limite mínimo de umidade do grão para se desenvolverem. Para *A. restrictus* é de 13,2%, para *A. candidus* é de 15,0% e para *A. flavus* é de 18,0%. Portanto, o tipo de fungo presente em um dado lote de sementes ou grãos, usualmente indica o teor de umidade do produto.

CHRISTENSEN & KAUFMANN (1969), mencionam que, o desenvolvimento de fungos de campo e de armazenamento em sementes, depende basicamente do teor de umidade e da temperatura do produto.

CHRISTENSEN & MERONUCK (1986) e LÁZZARI (1993), além dos fungos de campo e do armazém, mencionam um terceiro grupo, os fungos intermediários. Estes necessitam de um teor de umidade nas sementes e grãos que estejam em equilíbrio com uma umidade relativa U.R.(%) de 85 a 90% para crescerem. Estes níveis de U.R. equivaleria a um teor de umidade no grão de 20 a 25%. Nesta categoria estão enquadrados algumas espécies de *Penicillium spp.* e *Fusarium spp.*. Abaixo de 20% de umidade estes fungos não crescem.

CHRISTENSEN (1972), pesquisou níveis de temperaturas e umidade relativa necessárias para o desenvolvimento de fungos de armazenamento. Observou-se que *A. glaucus* necessita de uma temperatura mínima de 5 - 10°C, ótima de 30 - 35°C e a máxima de 40 - 45°C, em uma umidade relativa mínima de 70,0%. Já para o *A. flavus* a temperatura mínima é 10 - 15°C, a ótima 40 - 45°C e a máxima 45 - 50°C, com uma umidade relativa mínima de 85,0%. Para o *Penicillium spp.* a temperatura mínima é -5 - 0°C, a ótima de 20 - 25°C e a máxima 35 - 40°C, com umidade relativa mínima de 85,0%.

De acordo com LÁZZARI (1993), fungos de armazenamento são sensíveis às mudanças de temperatura. Quando a temperatura estiver abaixo de 12 - 15°C o seu desenvolvimento é bastante reduzido com exceção do *Penicillium spp.* .. Menciona

também que, diferenças altas de temperatura, dentro da massa de grãos, causam transferência de vapor d'água da porção mais quente, para a porção mais fria que condensa, umidifica os grãos e fornece as condições para o desenvolvimento de fungos em focos ou camadas, dentro da massa de grãos. O uso eficiente da termometria e da aeração é um fator decisivo para evitar-se migração de umidade e os problemas decorrentes do desenvolvimento fúngico.

Quanto aos testes de sanidade de sementes, LUCCA FILHO (1987), faz referência a existência de vários testes que podem ser empregados para caracterizar o estado sanitário das sementes. A escolha do método a ser utilizado está na dependência do patógeno a ser detectado, da infra-estrutura laboratorial, da espécie de semente testada, do objetivo do teste e do grau de treinamento do pessoal que interpretará o teste.

HOCKING & PITT (1993), lembraram que todos os meios de isolamento e de crescimento de fungos tem um certo nível de especificidade e que alguns meios são específicos para determinadas espécies de fungos.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Plaqueamento em Papel Filtro (Blotter)**

Um total de 200 sementes de milho foram analisadas para cada amostra. Utilizou-se 10 caixas gerbox lavados com hipoclorito de sódio e com papel filtro imerso em água destilada assentado no fundo das mesmas. Colocaram-se 20 sementes de milho em cada caixa gerbox, distribuídas em quatro fileiras com cinco sementes cada. As sementes foram assentadas de modo que os embriões de uma fileira, ficaram opostos ao de outra, para evitar contaminação que prejudicaria a avaliação do material. As caixas gerbox foram colocadas em bandeja de germinador e incubadas por uma semana a 25°C, 60,0% de U.R.(%) e fotofase de 12 horas. Na leitura das mesmas anotou-se a presença de fungos e quais os gêneros. O número de sementes infectadas era contado e calculava-se a percentagem de contaminação.

#### **3.2. Plaqueamento em Meio de Ágar de Suco de Tomate(MAST) e Meio de Batata Dextrose-Ágar(MBDA)**

Lavaram-se aproximadamente, 120 grãos de milho numa solução de Hipoclorito de Sódio a 2,0%, por um minuto, agitando-se o frasco energicamente. Após a lavagem assentou-se o frasco com a boca virada para baixo, sobre uma toalha de papel esterilizada, para escorrer o excesso de solução. Para cada amostra foram feitas quatro repetições, com 15 grãos cada. Duas repetições foram plaqueadas em Meio de Ágar de Suco de Tomate (MAST) e duas em Meio Batata Dextrose-Ágar (MBDA). Em Câmara Asséptica de Fluxo Contínuo, procedeu-se o plaqueamento das sementes de milho que foram incubadas à temperatura de 25°C com fotofase de 12 horas. As leituras das placas realizavam-se aos quatro e sete dias, anotando-se a quantidade e

gênero de fungos encontrados, calculando-se a percentagem de infecção para cada amostra e meio de cultura.

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes aos métodos de plaqueamento para a identificação de fungos em grãos de milho, estão nas Tabelas I, II, III e Figuras 1, 2, 3 respectivamente.

A Tabela I mostra que, independente dos diferentes tratamentos (Malathion, Deltamethrina e Testemunha), os mesmos gêneros de fungos e em níveis similares foram detectados, através do Método de Papel Filtro (Blotter). Os fungos detectados neste método foram *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.* e *Cephalosporium spp.*. O método mostrou-se mais eficiente na detecção de *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* e menos eficiente na detecção de *Fusarium spp.*. Independente do tratamento a quantidade de *Aspergillus spp.* aumentou ao longo do experimento, inicialmente de 0 e 43% de grãos infectados, aos 60 dias entre 43 e 63%, e aos 181 dias entre 63 e 83%. Para o *Penicillium spp.* a percentagem de contaminação variou entre 63 e 83% para todos os tratamentos ocorrendo uma queda após 120 dias de armazenamento, com predomínio de infecção entre 23 e 43%. *Cephalosporium spp.* surgiu em todos os tratamentos, com percentagens de infecção inferior a 23% e aos 181 dias os três tratamentos apresentaram níveis entre 23 e 43%.

A Tabela II, apresenta os fungos detectados através do meio MAST, sendo seus níveis de infecção similares. Os fungos identificados foram *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Cladosporium spp.* e *Cephalosporium spp.*. Percentualmente notou-se uma maior contaminação de *Fusarium spp.*, independente do tratamento. Na detecção de *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* sua eficiência é inferior a obtida no método de Blotter. Para o *Fusarium spp.* dos zero aos 120 dias ocorreu predominância de percentagens entre 23 e 43%. A partir dos 153 dias ocorreram contaminações inferiores a 23%. Para *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*,

predominaram durante todo o experimento porcentagens inferiores a 23% de contaminação. O *Cladosporium spp.* ocorreu esporadicamente, com níveis de contaminação inferior a 23%.

Tabela I - Porcentagens de infecção e fungos detectados pelo Blotter em milho.

D I A S A P O S A P L I C A Ç Ã O	BLOTTER			FUNGOS
	T E S T E M U N H A	M A L A T H I O N	D E L T A M E T H R I N A	
0	•	•	•	<i>Fusarium spp</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp</i>
15	•	•	•	<i>Fusarium spp</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp</i>
30	•	•	•	<i>Fusarium spp</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp</i>
	•	•	•	<i>Cephalosporium spp</i>
60		•	•	<i>Fusarium spp</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp</i>
	●	•	●	<i>Penicillium spp</i>
	•	•	•	<i>Cephalosporium spp</i>
91		•	•	<i>Fusarium spp</i>
	•	●	●	<i>Aspergillus spp</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp</i>
	•	•	•	<i>Cephalosporium spp</i>
120			•	<i>Fusarium spp</i>
	•	●	●	<i>Aspergillus spp</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp</i>
	•	•	•	<i>Cephalosporium spp</i>
153			•	<i>Fusarium spp</i>
	•	●	●	<i>Aspergillus spp</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp</i>
	•	•	•	<i>Cephalosporium spp</i>
181	•	•	•	<i>Aspergillus spp</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp</i>
	•	•	•	<i>Cephalosporium spp</i>

- 0 — 23 (%)
- 23 — 43 (%)
- 43 — 63 (%)
- 63 — 83 (%)
- 83 — 100 (%)



Tabela II. Porcentagens de infecção e fungos detectados pelo MAST em milho.

D I A S  A P L I C A Ç Ã O  A P O S	MAST			FUNGOS
	T E S T E M U N H A	M A L A T H I O N	D E L T A M E T H R I N A	
0	•	•	•	<i>Fusarium</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
		•	•	<i>Penicillium spp.</i>
15	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
		•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp.</i>
30	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp.</i>
			•	<i>Cephalosporium spp.</i>
60	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp.</i>
			•	<i>Cephalosporium spp.</i>
			•	<i>Cladosporium spp.</i>
91	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp.</i>
120	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
		•	•	<i>Penicillium spp.</i>
153	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp.</i>
181	•	•	•	<i>Fusarium spp.</i>
	•	•	•	<i>Aspergillus spp.</i>
	•	•	•	<i>Penicillium spp.</i>
		•		<i>Cladosporium spp.</i>

- 0 — 23 (%)
- 23 — 43 (%)
- 43 — 63 (%)
- 63 — 83 (%)
- 83 — 100 (%)

A análise da Tabela III demonstra que em todos os tratamentos, os mesmos fungos foram detectados através do meio MBDA, *Fusarium spp.*, *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.*. Percentualmente notou-se maior detecção de *Fusarium spp.* através do MBDA, independente do tratamento realizado. Comparado com o MAST e o Blotter verifica-se a superioridade do MBDA na detecção de *Fusarium spp.*. Para *Aspergillus spp.* e *Penicillium spp.* sua eficiência é inferior à detecção obtida no método

de Blotter. A percentagem de grãos contaminados por *Fusarium* spp., ficou entre 63 e 83% durante os 181 dias. *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. apresentaram percentagens de infecção inferiores a 23%.

Tabela III - Porcentagens de infecção e fungos detectados pelo MBDA em milho.

DIAS APÓS APLICACÃO	MBDA			FUNGOS
	TESTE MUNHA	MALATHION	DELTAMETHRINA	
0	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
15	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
30	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
60	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
91	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
120	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
153	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>
181	●	●	●	<i>Fusarium spp.</i>
	●	●	●	<i>Aspergillus spp.</i>
	●	●	●	<i>Penicillium spp.</i>

● 0—23(%)

● 23—43(%)

● 43—63(%)

● 63—83(%)

● 83—100(%)

As Figuras 1, 2, 3 apresentam as porcentagens de *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., detectadas nos grãos de milho plaqueados pelos três métodos.

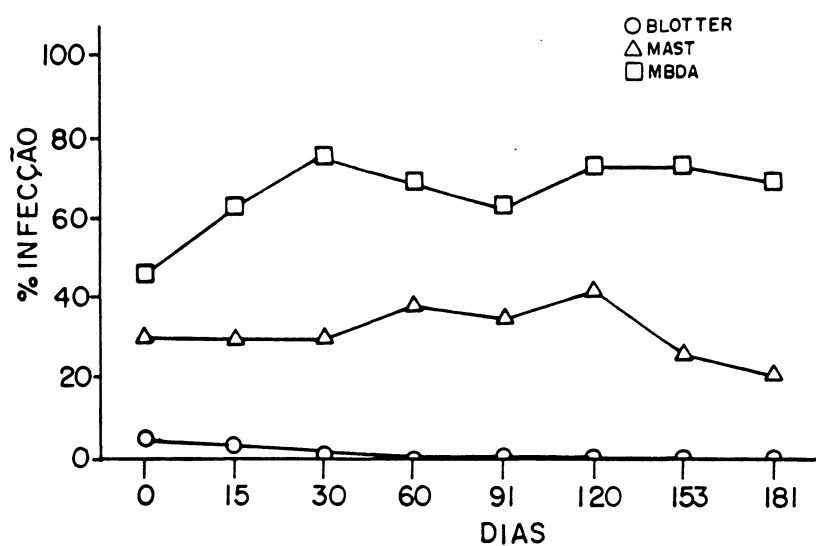


Figura 1. Porcentagem de infecção de *Fusarium* spp. nos grãos de milho plaqueados nos meios Blotter, MAST e MBDA.

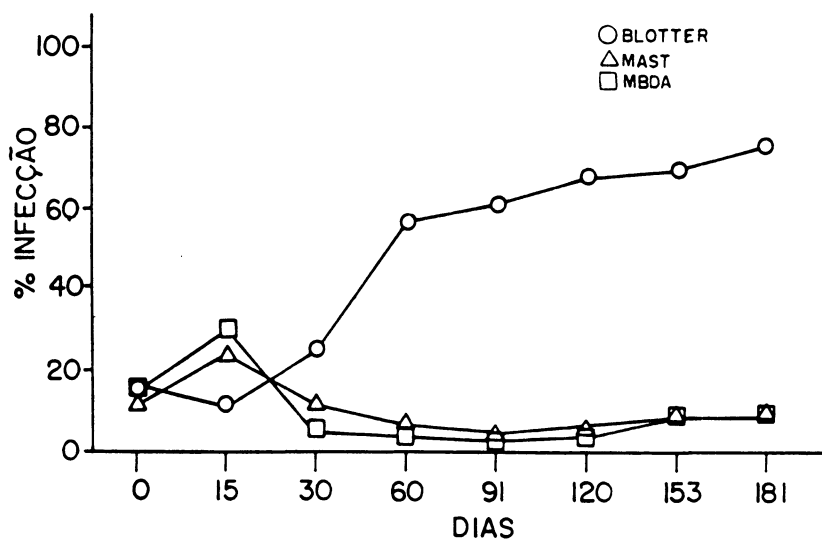


Figura 2. Porcentagem de infecção de *Aspergillus* spp. nos grãos de milho plaqueados nos meios Blotter, MAST e MBDA.

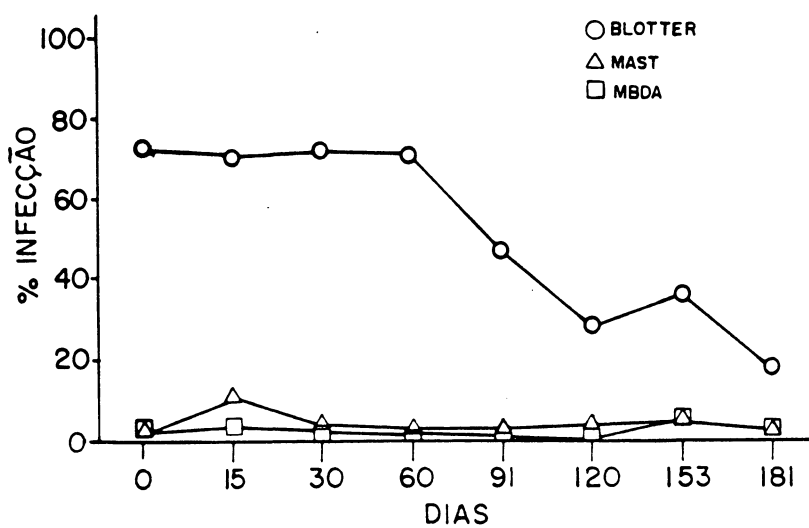


Figura 3. Porcentagem de infecção de *Penicillium* spp. nos grãos de milho plaqueados nos meios Blotter, MAST e MBDA.

Com os resultados obtidos, pode-se afirmar que nos métodos Blotter, MAST e MBDA, os mesmos gêneros de fungos, foram identificados. *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., foram detectados nos meios Blotter, MAST e MBDA. *Cephalosporium* spp. e o *Cladosporium* spp. foram isolados das sementes de milho nos métodos Blotter e MAST. Também ficou caracterizado que os tratamentos realizados não interferiram no desenvolvimento dos fungos detectados.

Os dados obtidos no experimento confirmam a afirmação de LUCCA FILHO (1987) que, a escolha do método a ser utilizado, está na dependência do patógeno a ser detectado, da espécie de semente e do objetivo do teste.

As condições de umidade relativa (69,2%) e o teor de umidade das sementes (11,7%) estavam em níveis considerados seguros para a armazenagem do milho. Estes níveis estão bastante afastados dos 85 a 90% de U.R.(%) e dos 20 a 25% de umidade do grão, considerados por CHRISTENSEN & MERONUCK (1986) e LÁZZARI (1993), como adequados para o crescimento de *Penicillium* spp. e *Fusarium* spp..

Os meios Blotter, MAST e MBDA propiciaram a detecção dos fungos para cada semente, sem quantificar-se o nível de infecção. Isto é, maiores porcentagens, significam maior número de sementes infectadas, não se considerando o grau de infecção de cada semente.

WETZEL (1987), considerou que *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp., desenvolvem-se em sementes cuja a umidade(%) esteja em equilíbrio com a U.R.(%) entre 65 e 90%. Esta afirmação foi comprovada no experimento, em função dos níveis de umidade relativa mensurados.

Quanto à temperatura, verificou-se como temperatura máxima 26,5°C e mínima 16,4°C. Tais níveis encontram-se dentro dos intervalos de valores considerados por CHRISTENSEN (1972), como favoráveis para o desenvolvimento de *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.. As temperaturas médias foram sempre superiores a 15°C, considerada por LÁZZARI (1993), como crítica, para o desenvolvimento da maioria dos fungos de armazenamento com exceção de *Penicillium* spp.

Analisando a Tabela IV e a FIGURA 4, observa-se que a temperatura se elevou, a U.R.(%) diminuiu, permanecendo em níveis quase que constantes nos últimos 90 dias do experimento.

Tabela IV. Médias da temperatura (T), U.R.(%), umidade do grão tratado (U.G.Tr), umidade do grão testemunha (U.G.Te) e intensidade de luz (I.L) medidas durante o experimento.

Dias após o tratamento	T (°C)	U.R. (%)	U.G.Tr. (%)	U.G.Te. (%)	I.L.	
					Lux	W/m <sup>2</sup>
30	16,48	69,21	11,7	11,1	1,17	0,0117
60	18,92	69,54	11,7	11,5	2,10	0,0210
91	22,37	66,23	11,5	11,1	4,88	0,0488
120	22,25	59,88	11,0	10,9	3,95	0,0395
153	24,89	58,03	10,9	11,1	8,14	0,0814
181	26,54	59,47	11,0	11,1	8,30	0,0830

A temperatura, umidade relativa do ar e umidade do grão, não atingiram níveis considerados ótimos para o desenvolvimento de fungos. Os dados registrados, comprovam a interdependência existente entre temperatura, umidade relativa do ar e umidade do grão, havendo a necessidade de controle simultâneo destes fatores.

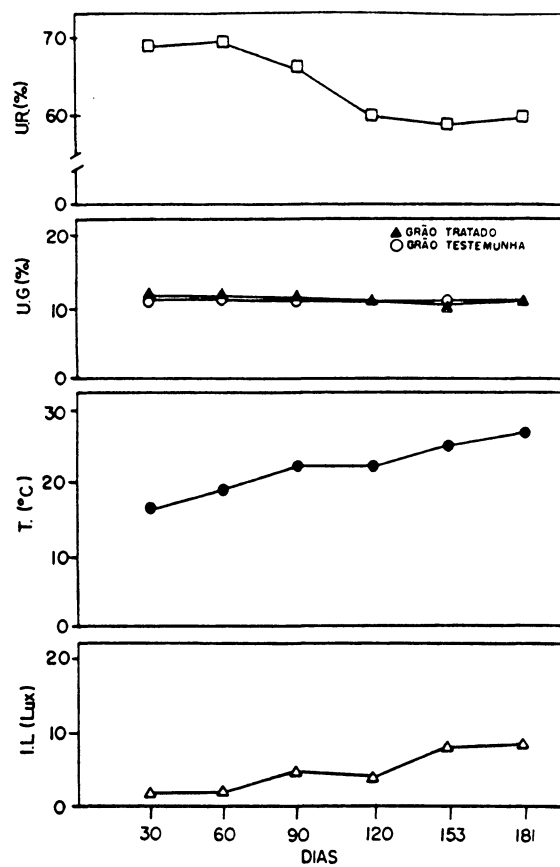


Figura 4. Temperatura, U.R.(%), umidade da semente tratada e da testemunha e intensidade de luz na unidade experimental.



## 5. CONCLUSÕES

As 1120 análises fúngicas realizadas para as 80 amostras do experimento, com os métodos Blotter, MAST e MBDA, permitiram chegar as seguintes conclusões:

5.1. Nos métodos Blotter, MAST e MBDA independente dos tratamentos, os gêneros de fungos detectados foram *Fusarium* spp., *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp.;

5.2. O Blotter percentualmente detectou mais *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. e menos *Fusarium* spp.;

5.3. O MBDA foi superior ao Blotter e ao MAST na detecção de *Fusarium* spp.;

5.4. O MAST foi superior ao Blotter e inferior ao MBDA na detecção de *Fusarium* spp., enquanto que, para *Aspergillus* spp. e *Penicillium* spp. este meio apresentou resultado similar ao MBDA e inferior ao Blotter;

5.5. O MAST e MBDA tendem a mostrar os níveis reais de infecção interna das sementes, enquanto o Blotter tende a mostrar os níveis de contaminação externa;

5.6. Os tratamentos com Malathion e Deltamethrina não interferiram com o desenvolvimento dos fungos, relativamente a cada método de detecção utilizado.

5.7. O trabalho evidenciou a especificidade dos métodos e meios utilizados na detecção de microorganismos.

## 6. SUGESTÕES

De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir o desenvolvimento dos seguintes trabalhos:

6.1. Realizar-se a nível de silos e armazéns, estudo similar ao presente trabalho, visando comparar o nível de detecção dos fungos nestes locais, através dos métodos Plaqueamento em Papel Filtro (BLOTTER), Meio de Ágar de Suco de Tomate (MAST) e em Meio de Batata Dextrose-Ágar (MBDA) para milho e outras culturas armazenadas a granel;

6.2. Monitorar nas principais culturas armazenadas a granel nos silos e armazéns, a presença de *Aspergillus* spp., visando estabelecer os níveis de contaminação com este fungo.

## 7- REFERÊNCIAS CITADAS

- CHRISTENSEN, C.M. (1972). Microflora and Seed Deterioration. *In*: Roberts, E.H. (ed.) **Viability of Seeds**. Great Britain, Syracuse University Press, 59-93p.
- CHRISTENSEN, C.M. & H.H. KAUFMANN (1969). **Grain Storage: the role of fungi in quality loss**. Mineapolis, University of Minnesota Press, 153p.
- CHRISTENSEN, C.M. & R.A. MERONUCK (1986). **Quality Maintenance In stored Grains and Seeds**. Minneapolis, University of Minnesota Press, 138p.
- HOCKING, A.L. & J. PITT (1993). **Fungi and Micotoxin in Stored Products** - ACIAR Proceedings n.36, 270p.
- LÁZZARI, F.A. (1993). **Umidade, Fungos e Micotoxinas na Qualidade de Sementes, Grãos e Rações**. Curitiba, Flávio A. Lázzari, 140p.
- LUCCA FILHO, O.A. (1987). Metodologia dos Testes de Sanidade de Sementes, p. 276-8 *In*: J. Soave & M. V. S. Wetzel (eds.). **Patologia de Sementes**. Campinas, Fund. Cargill, XIV+480p.
- MACHADO, J.C. (1987). Introdução à Patologia de Sementes, p. 3-15. *In*: J. Soave & M. V. S. Wetzel (eds.). **Patologia de Sementes**. Campinas, Fund. Cargill, XIV+480p.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E REFORMA AGRÁRIA (1992). **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, Ministério da Agricultura e Reforma Agrária, 355p.
- NEERGAARD, P. (1977). **Seed Pathology**. London and Basingstoke, Macmillan Press, 1187p.

WETZEL, M.V.S. (1987). Fungos de Armazenamento. p. 260-275. *In*: J. Soave & M.V.S. Wetzel (ed.). **Patologia de Sementes**. Campinas, Fund. Cargill, XIV+480p.